

Exhibit 1

JP 2004-500042 A 2004.1.8

(10) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500042

(P2004-500042A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/00	C12N 15/00 Z N A A	4B024
A61K 35/74	A61K 35/74 A	4B065
A61K 38/00	A61K 45/00	4C084
A61K 38/43	A61K 48/00	4C087
A61K 45/00	A61P 35/00	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 200 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-528552(P2001-528552)	(71) 出願人	500115262 ヴァイオン ファーマシューティカルズ、 インコーポレーテッド アメリカ合衆国 O G S I I コネチカッ ト州、ニュー ヘイブン、フォー サイエ ンス パーク (指定なし)
(86) (22) 出願日	平成12年8月24日(2000.8.24)	(74) 代理人	100081096 弁理士 平本 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成14年4月4日(2002.4.4)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/023242	(74) 代理人	100083183 弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開番号	W02001/025397		
(87) 国際公開日	平成13年4月12日(2001.4.12)		
(31) 優先権主張番号	60/157,500		
(32) 優先日	平成11年10月4日(1999.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/157,581		
(32) 優先日	平成11年10月4日(1999.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/157,637		
(32) 優先日	平成11年10月4日(1999.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エフェクター分子の腫瘍標的送達のための組成物および方法

(57) 【要約】

本出願は、固形腫瘍の部位に1つ以上の一次エフェクター分子を送達するための弱毒性腫瘍標的細菌(attenuated tumor-targeted bacteria)ベクターの作製ならびに使用を開示する。本発明の一次エフェクター分子は、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍を治療するために本発明の方法において用いられる。本発明は、宿主に全身投与する場合においては毒性でありうるエフェクター分子を、宿主への毒性を低下させた弱毒性腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるという驚くべき知見に関する。本出願はまた、一次エフェクター分子と共に弱毒性腫瘍標的細菌によって送達され得る1つ以上の任意のエフェクター分子(二次エフェクター分子と呼ばれる)の送達を開示する。

ATG GGA CCG AGC TGG TCT CCG ACT GGA TGG TAT AGG DGG GTT GCT
P Y B S S S R T F S O E P Y A
CAT GTA GTG GGA AGC GCG CAG GGA CAA GCG CAG CCG GCG AGG LTP
A Y E A B Q Q A E S G E D V L
AGT GGT GCG GGT AGC GGT CCG CCG GGA AGC GCG GGT GAC GCG GGT
N Q R J B A L A N Q P E L Y
GAT AGC CAG GTC GAG GGA GGT TGT GGA GGT GTC GAG GTC AGC TAT
P H O L Y Y P S E G L J L E T
TGT CAA GGA GTC TTC AGC GGT CAG GCG GAG GCG GAG AGC GGT GTC
S Q Y L Z K G Q S C P S T N Y
CTG GTC AGC GAG AGC AGC AGC GGT ATG GGT GTC TAC GAG GCG
E L Y R T F S R J A P S T Q F
AAA GTT AAG GTC CCG GGT GGT AGC AGG GCG GCG GCG GCG GGT GAG
N V M L I S A I C S D C B A L
ATG GCG GAG GGT GCA GGA GGA GGA GGA GGT GAT GAG GAG AGC GAC
T F F G A E A K P H Y E P E Y
GTC GGT GCG GGT GTC CAG GCG GAG GAG GGT GAC GGT GTC GTC GCA
R Q G V F Q L E G S D R I Z A
GAG AGC AGC GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT
E T R R P D E L D P A E S O H
GTC TAC TTC GGT ATG AGC GGA GGA GGA
Y Y F G I F A L P

(2)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 3】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

10

【請求項 4】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項3に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

20

【請求項 5】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 6】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI、II、フィブロンекチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7、8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロンекチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項5に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

30

【請求項 7】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 8】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、フチリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピオシン、またはマイクロシンM15である、請求項7に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

40

【請求項 9】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 10】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項9に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

50

(3)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

細菌。

【請求項 1 1】

一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF 1、CNF 2、またはFMTである、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 2】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 3】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 10

【請求項 1 4】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項 1 または 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 5】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項 1 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 6】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子 (BRP) である、請求項 2 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 7】

1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上の融合タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。 20

【請求項 1 8】

1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上の融合タンパク質をコードする 1 つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 9】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項 1 8 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 30

【請求項 2 0】

シグナル配列がOmp A様タンパク質である、請求項 1 7 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 1】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアルホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP 2 2、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項 1 3 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 2】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 1 7、1 8 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 40

【請求項 2 3】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1 つ以上のプロモーターに機能的に連結された 1 つ以上のエフェクター分子をコードする 1 つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項 1 7、1 8 または 1 9 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 4】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 2 3 に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 2 5】

50

(4)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項26】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物。

【請求項27】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項25または26に記載の医薬組成物。 10

【請求項28】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITRLである、請求項27に記載の医薬組成物。

【請求項29】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項25または26に記載の医薬組成物。 20

【請求項30】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI II、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、 α PA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項29に記載の医薬組成物。 30

【請求項31】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項32】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項31に記載の医薬組成物。 40

【請求項33】

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酵素である、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項34】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項35】

50

(5)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

少なくとも1つの一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項36】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項37】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項38】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項25または26に記載の医薬組成物。 19

【請求項39】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項25に記載の医薬組成物。

【請求項40】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項41】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。 20

【請求項42】

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。

【請求項43】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項42に記載の医薬組成物。

【請求項44】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項41または43に記載の医薬組成物。 30

【請求項45】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項42または43に記載の医薬組成物。

【請求項46】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。

【請求項47】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項41、42または43に記載の医薬組成物。 40

【請求項48】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項49】

50

(5)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

固形腫瘍の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項50】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項51】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項53】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI II、フィブネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7、8 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項48または49に記載の方法。

【請求項55】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ビプリオシン、またはミクロシンM15である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項57】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項59】

(7)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

一次エフェクター分子の少なくとも1つが動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項60】

二次エフェクター分子の少なくとも1つが抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項49に記載の方法。

【請求項61】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項48または49に記載の方法。

【請求項62】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項48に記載の方法。

19

【請求項63】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項49に記載の方法。

【請求項64】

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項65】

20

固形腫瘍癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を送達する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項66】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

シグナル配列がOmp A様タンパク質である、請求項64または66に記載の方法。

30

【請求項68】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項65または66に記載の方法。

【請求項69】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項64、65または66に記載の方法。

【請求項70】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項64、65または66に記載の方法。

40

【請求項71】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項72】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エ

50

(8)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項73】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項74】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項71または72に記載の方法。

【請求項76】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンI1I、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、 α PA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ もしくはVEGF受容体のペプチドアンタゴニストである、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項71または72に記載の方法。

【請求項78】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プテリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、ピプリオシン、またはマイクロシンM15である、請求項77に記載の方法。

【請求項79】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項71または72に記載の方法。

【請求項80】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはFMTである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項82】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項71または72に記載の方法。

【請求項83】

(9)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ (*Salmonella*) である、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 8 7】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項 8 8】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフ

【請求項 8 9】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

シグナル配列がOmp A様タンパク質である、請求項 8 7 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアルホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP 2 2、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項 8 8 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 2】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項 8 7、8 8 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 3】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項 8 7、8 8 または 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 4】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と弱毒化腫瘍標的細菌とを含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる、上記方法。

【請求項 9 5】

Omp A様タンパク質およびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 9 6】

シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項 9 7】

シグナル配列がOmp A様タンパク質である、請求項 9 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 8】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアルホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘ

(10)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ルベスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、請求項96に記載の融合タンパク質。

【請求項99】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項95または96に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は1999年10月4日出願の米国仮特許出願60/157,500、60/157,581、及び60/157,637に対する優先権を主張し、それらの各々の内容は参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

19

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、固形腫瘍を治療又は阻害するための、固形腫瘍への1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の送達に関する。特に、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位に1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）を送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌（attenuated tumor-targeted bacteria）、例えばサルモネラ（*Salmonella*）、の調製及び使用に関する。特に、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1種以上の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）をコードするように改変されている通性好気性菌又は通性嫌気性菌である。本発明の一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）には、TNFサイトカイン・ファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドが含まれる。本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫、又はこれらの腫瘍から誘導される転移物のような固形腫瘍癌の治療に有用である。本発明は、さらに、一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）、例えば、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドを、宿主に対する毒性及び免疫学的合併症を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達できるという驚くべき発見に関する。また、本発明は、一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）と共に弱毒化腫瘍標的細菌によって送達することができる1種以上の任意のエフェクター分子（1種もしくは複数種）（「二次エフェクター分子」と呼ばれる）の送達にも関する。この二次エフェクター分子（1種もしくは複数種）はさらなる抗腫瘍治療活性を提供し、弱毒化腫瘍標的細菌からの一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の放出を増強し、及び／又は適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位での一次エフェクター分子（1種もしくは複数種）の取り込みを増強する。

20

30

【0003】

2. 発明の背景

新生物、すなわち腫瘍は異常な細胞の増殖の結果生じる新生物塊であり、良性又は悪性であり得る。良性腫瘍は、一般には、局在したままである。悪性腫瘍は、一般には、隣接体組織に浸潤してそれを破壊する潜在能力を有し、離れた部位まで広がって死を引き起こす（レビューには、Robins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122を参照）。腫瘍は、ある器官もしくは組織から別のものに広がったときに転移していると言われる。

40

【0004】

固形腫瘍癌の化学療法における主な問題は、同時に正常細胞に対する損傷を最小にしながらの、腫瘍細胞を根絶するのに十分な濃度での治療作用物質、例えば、薬物の送達である。したがって、多くの研究室における研究は生物学的送達系、例えば、薬物を標的送達するための抗体、サイトカイン、及びウイルス、プロドラッグ変換酵素、及び／又は腫瘍細胞に入れる遺伝子の設計に向けられている（例えば、Crystal, R. G., 1995, Science 270:404-110を参照）。

【0005】

50

2. 1. 細胞性免疫及びサイトカイン

癌を治療するための方策の1つは、細胞性免疫応答を増強又は活性化することを含む。自己腫瘍に向けられた細胞性免疫応答をうまく誘導することで従来の化学療法を上回る幾つかの利点が得られる：1) 免疫認識は高度に特異的であり、排他的に腫瘍に向かう；2) 免疫監視によって転移部位での増殖を抑制することができる；3) 免疫応答及び認識の多様性は腫瘍細胞によって用いられる異なる耐性機構を補償することができる；4) 細胞傷害性T細胞のクローン性増殖が増殖する腫瘍よりも迅速に起こり得、その結果として最終的に腫瘍を征圧する抗腫瘍機構が生じる；及び5) 記憶応答が、物理的な検出の前に、疾患の再発をその最初段階で抑制することができる。応答を示す患者の臨床的研究は、成功する免疫療法が、CD4+T細胞、マクロファージ、及びNK細胞の関与について証拠が存在するものの、CD8+T細胞（クラスI応答）の活性化を含むことを示す動物モデルからの結果を支持している。例えば、Chapoval et al., 1998, J. Immunol., 161:6977-6984; Gollob et al., 1998, J. Clin. Invest., 102:561-575; Kikuchi et al., 1999, Int. J. Cancer 80:425-430; Pan et al., 1995, Int. J. Cancer 80:425-430; Saffran et al., 1998, Cancer Gene Ther. 5:321-330; 及び Zimmermann et al., 1999, Eur. J. Immunol., 29:284-290を参照のこと。

[0006]

2. 2. サイトカインの腫瘍壊死因子（TNF）ファミリー

TNFファミリーの最も特徴付けられたメンバーはTNF- α である。TNF- α は免疫系に対して多面的な効果を発揮することが知られている。TNF- α は腫瘍細胞に対して強力な細胞傷害性効果を直接発揮することができるサイトカインである。TNF- α は、一般には、他の機構、例えば、増殖及び分化の刺激、並びに単球におけるアポトーシスの防止（例えば、Mangan et al., 1991, J. Immunol., 146:1541-1546; 及び Ostensen et al., 1987, J. Immunol., 138:4185-4191を参照）、最終的には腫瘍内での血餅形成につながる、組織因子様凝血原活性の促進及び内皮細胞表面抗凝血活性の抑制（Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol., 7:625-655; 及び Vassalli, P., 1992, Ann. Rev. Immunol., 10:411-452においてレビューされている）。しかしながら、これらの特性の結果として、汎発性血管内凝血のため、TNF- α の全身投与は宿主に致命的な結果を生じる。

[0007]

他のサイトカインも抗腫瘍応答に関連付けられている。IL-2はクラスIサイトカインであり、やはり抗腫瘍応答において役割を果たすものと考えられている。例えば、自発的に進行する黒色腫はTNF- α 及びIL-2の腫瘍内レベルの上昇に関連付けられている。例えば、Beutler and Cerami, 1989, Annu. Rev. Immunol., 7:625-655; Lowes et al., 1997, J. Invest. Dermatol., 108:914-919; Mangan et al., 1991, J. Immunol., 146:1541-1546; Scheruich et al., 1987, J. Immunol., 138:1786-1790を参照のこと。

[0008]

TNF- α 及びIL-2の両者はリンパ球の帰巢（homing）を助け、IL-2はナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞、及びリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞の腫瘍浸潤を誘発することが示されている（例えば、Etter et al., 1998, Cytokine 10:395-403; Reinhardt et al., 1997, Blood 89:3837-46; Chen et al., 1997, J.

Neuropathol. Exp. Neurol. 56:541-50;Vora et al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 105:155-62;Luscinskase et al., 1996, J. Immunol. 157:326-35;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47, 532-540;Johansson et al., 1996, Nat. Immun. 15:87-97;及びWatanabe et al., 1997, Am. J. Pathol. 150:1869-80を参照)。TNF- α 及びIL-2の両者の存在下においては、TNF非感受性細胞株に向けられたときでさえ、NK及びLAK細胞の細胞溶解活性が増加する(例えば、Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191を参照)。しかしながら、IL-2の治療用レベルは宿主に対して毒性であることも示されている。 10

[0009]

明らかに、全身サイトカイン投与に起因する用量制限性の毒性は癌治療におけるサイトカインの潜在能力の実現に重大な障壁を突きつける。さらに、全身性のサイトカイン送達は、望ましくない臨床的副作用に加えて、同系T細胞の増殖の減少を生じ、したがって、標的免疫治療に対立することがある。Addison et al., 1998, Gene Ther. 5:1400-1409;Albertini et al., 1997, Clin. Cancer Res. 3:1277-1288;Becker et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7826-7831;Book et al., 1998, J. Neuroimmunol. 92:50-59;Cao et al., 1998, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 124:88-92;D'Angelica et al., 1999, Cancer Immunol. Immunother. 47:265-271;Deszo et al., 1996, Clin. Cancer Res. 2:1543-1552;Kjaergaard et al., 1998, Scand. J. Immunol. 47:532-540;Ostensen et al., 1987, J. Immunol. 138:4185-4191;及びSchirmacher et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4:2635-2645を参照のこと。 20

[0010]

2. 3. サイトカインの送達

近年の実験的動物及び臨床研究では、サイトカインの亜全身性(sub-systemic)又は代替送達方法により、サイトカインの全身毒性を回避し、かつより高用量を投与する試みがなされている。ネズミモデルにおいては、膜融合リポソーム封入TNF- α 遺伝子の投与、及び腫瘍血管構造に局在し得るポリエチレングリコール封入TNF- α の全身投与で肉腫-180腫瘍が治療されている(Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085を参照)。内皮単球活性化ポリペプチドIIIによるTNF- α に対する腫瘍の感作も報告されている(Marvin et al., 1999, J. Surg. Res. 63:248-255;Wu et al., 1996, Cancer Res. 59:205-212)。 30

[0011]

臨床研究において、インターフェロン- α 又はメルファランと組み合わせた隔離肢灌流(isolated limb perfusion)による患者への高用量TNF- α の投与の後、完全な腫瘍の根絶が観察されている。しかしながら、この技術は、治療の後にサイトカインが完全に除去されない場合、患者に重大な危険をもたらす。さらに、これらの治療は肢隔離を必要とし、これはそれ自体が患者に危険をもたらす。Eggermont et al., 1997, Semin. Oncol. 24:547-555;Fraker et al., 1995, Cancer J. Sci. Am. 1:122-130;Lejeune et al., 1998, Curr. Opin. Immunol. 10:573-580;Marvin et al., 1996, J. Surg. 50

(13)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Res. 63:248-255; Mizuguchi et al., 1998, Cancer Res. 58:5725-5730; Tsutsumi et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085; 及び Wu et al., 1996, Cancer Res. 59, 205-212を参照のこと。

【0012】

Carrier et al., 1992, J. Immunol. 148:1176-81, Saltzman et al., 1997, Cancer Biother. Radiopharm. 12:37-45, Saltzman et al., 1997, J. Pediatr. Surgery 32:301-306による従来の研究では、IL-1 β (Carrier) 及び IL-2 (Saltzman) を自然のサルモネラ感染部位である肝臓及び脾臓に直接送達させてワクチン株としての役割を課すか、又は肝臓転移に影響を及ぼすのに弱毒化サルモネラ株の使用が報告されている。Saltzmanの研究ではサルモネラの経口投与が用いられ、ここでは細菌はGALT (腸随伴リンパ様組織 (gut associated lymphoid tissue) によって取り込まれ、肝臓及び脾臓に輸送される。しかしながら、これらの感染は自然の感染部位に限定される。

【0013】

2. 4. 血管新生及び腫瘍形成

癌を治療するための別の方策は血管新生の阻害を含む。血管新生は既存の血管からの新規毛細血管の増殖のプロセスである。新規毛細血管は、既存血管の内皮細胞が、マトリックス・メタロプロテアーゼのようなタンパク分解酵素を用いて、それらの近傍の基底膜を分解し、増殖させ、周囲間質組織内に移動させ、微小管を形成するプロセスによって形成される。この血管新生のプロセスは負及び正の因子の相互作用によって非常に厳密に調節されており、成人においては、通常女性の生殖周期及び創傷の修復に限定される (Malonne et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis 17:1-14)。血管新生の異常調節が、糖尿病性網膜症、乾癬、関節リウマチ、心血管病、及び腫瘍形成を含む多くのヒト障害に関連付けられている (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。

【0014】

血管新生は腫瘍の成長及び転移にとって最も重要なプロセスである。腫瘍の形成は2つの段階、前血管及び血管段階に分けられる。前血管腫瘍の細胞が血管新生化腫瘍に由来する細胞と同程度に迅速に増殖することが研究によって示されている。しかしながら、前血管腫瘍が2-3mm³を上回るまで増殖することはほとんどなく、これは細胞増殖と細胞死との間に平衡が存在するためであり、後者は前血管腫瘍の低酸素性から生じるものである (Folkman, 1995, Nat. Med. 1:27-31)。前血管から血管段階への切り替えには、負の因子が優勢である正味のバランスから正の因子、例えば、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) が優性であるものへの血管新生の調節因子のバランスの移動を必要とする (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。調節因子間のバランスの移動は血管新生因子の上方調節とそれと同時の抗血管新生因子の下方調節の結果である (Folkman, 1995, N. Eng. J. Med. 333:1757-1763)。

【0015】

2. 5. 抗血管新生因子

原発腫瘍がそれらの転移物の増殖をしばしば阻害する結果につながる幾つかの関連する現象に基づいて、抗血管新生因子が存在するものと仮定された (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176)。単離されるべきこれらの因子のうちの第1のものはマウス・アンジオスタチン、原発Lewis肺癌腫瘍によって循環中に放出され、二次転移物の増殖を防止するプラスミノゲンの38kDaタンパク分解性断片であった (O'Reilly et al., 1994, Cell 59

(14)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

179:315-328)。ヒトにおいては、マトロエラスターゼでのプラスミノゲンの制限タンパク分解によって産生される40、42及び45kDaのペプチドがマウス・アンギオスタチンに匹敵する抗血管新生活性を有する(O'Reilly et al., 1994, Cell 79:315-328)。プラスミノゲンそれ自体はそのような活性を持たない。腫瘍細胞それ自体は検出可能なアンギオスタチンmRNAを持たないため、腫瘍関連マクロファージがアンギオスタチンの産生の原因であることも考えられる。マクロファージのマトロエラスターゼの発現は、腫瘍細胞によって分泌される顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)によって誘導される(Dong et al., 1997, Cell 83:801-810)。特定の腫瘍においては、アンギオスタチン産生はマトロエラスターゼではなくセリンプロテアーゼによって触媒され、セリンプロテアーゼは腫瘍細胞によって直接産生される(Gately et al., 1997, Cancer Res. 56:4887-4890)。原発腫瘍を有する実験マウスにアンギオスタチンを100mg/kg/日の濃度で投与することで、毒性副作用なしに腫瘍増殖の強力な阻害が生じた。このアンギオスタチン処置の中止の2週間以内に腫瘍が再増殖し、この処置の結果として腫瘍は完全に死ぬのではなく休眠状態に退行することが示される(O'Reilly et al., 1996, Nat. Med. 2:689-692)。

[0016]

アンギオスタチンの発見後、幾つかの血管新生阻害性ペプチドを含む他の血管新生阻害物質が発見され、単離された。アンギオスタチンよりも強力な血管新生の阻害物質はクリングル5(kringle 5)、プラスミノゲンの第5クリングル・ドメインを含むペプチドである(アンギオスタチンはクリングル・ドメイン1-4を含む)。クリングル5はプラスミノゲンのタンパク分解によって産生することができ、組換え形態も活性である(Cao et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:22924-22928)。

[0017]

エンドスタチンはアンギオスタチンの単離に類似する方法で単離され(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)、その源はLewis肺癌腫ではなくネズミ血管内皮腫であった。このペプチドは20kDaの見かけの分子量を有し、その配列はコラーゲンXVIII、様々なコラーゲン分子の間で開散しているNC1と呼ばれる領域(Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4229-4233;及びRehn et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4238)のC末端に相当する(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)。マウスにおいて、Lewis肺癌腫転移物の増殖が0.3mg/kg/日の組換えエンドスタチンを投与することによって抑制され、このペプチドを20mg/kg/日で投与したときには原発腫瘍が休眠状態に退行する。機能的組換えエンドスタチンは封入体から、*in vitro*での変性及び再折り畳みにより、又は*in vivo*での皮下投与されたエンドスタチン封入体制剤の持続性放出により、産生させることができる(O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)。エンドスタチン発現プラスミドを筋肉内投与することからなるエンドスタチン送達の代替法は、マウスモデル系において、腫瘍増殖の部分的阻害のみを生じる(Blezniger et al., 1999, Nat. Biotech. 17:343-348)。同様に、静脈内送達された、リボソームに複合体化されたエンドスタチン又はアンギオテンシン・エンコーディングプラスミドは、乳癌のヌードマウスモデルにおいて、腫瘍増殖の部分的阻害を生じた(Chen et al., 1999, Cancer Res. 59:3308-3312)。

[0018]

近年、新規抗血管新生活性がSerpín(セリンプロテアーゼ阻害物質)抗トロンビンのC末端切断ペプチドに帰されている(O'Reilly et al., 1999, S

(15)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

science 285:1926-1925)。完全長抗トロンピンには固有の抗血管新生活性はないが、トロンピンによるそのタンパク質のC末端反応性ループの開裂により、抗トロンピンは強力な血管新生活性を獲得する。以下、このタンパク分解断片を抗血管新生性抗トロンピンと呼ぶ。

【0019】

当該技術分野において公知の他の血管新生阻害性ペプチドにはフィブロネクチンの29 kDa N末端及び40 kDa C末端タンパク分解断片 (Homandberg et al., 1985, J. Am. Pathol. 120:327-332) ; プロラクチンの16 kDaタンパク分解断片 (Clapp et al., 1993, Endocrinology 133:1292-1299) ; 及び血小板第4因子の7.8 kDaタンパク分解断片 (Gupta et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7799-7803) が含まれる。 10

【0020】

抗血管新生効果が示されている天然産生タンパク分解断片に加えて、公知の細胞外マトリックスタンパク質の領域に相当する幾つかの合成ペプチドが血管新生の阻害における活性について評価されている。機能的内皮阻害性物質、すなわち、血管新生阻害物質であることが示されている合成ペプチドには、血小板第4因子の断片に相当する13アミノ酸ペプチド (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083) ; コラーゲンIの断片に相当する14アミノ酸ペプチド (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511) ; トロンボスポンジンIの断片に相当する19アミノ酸ペプチド (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511) ; 及び、ヒト黒色腫細胞における発現が*in vitro*での細胞浸潤の減少及び*in vivo*ヌードマウスモデルにおける腫瘍形成能の減少につながる分泌性のシステインに富む細胞外マトリックス糖タンパク質である (Ledda et al., 1996, Nature Med. 3:171-176) SPARCの断片に相当する20アミノ酸ペプチド (Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334) が含まれる。 20

【0021】

血管新生を阻害し、かつラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲン、及びEGFの断片に相当する10アミノ酸未満の他のペプチドも記載されている (Cao, 1998, Prog. Mol. Subcell. Biol. 20:161-176 による総説を参照)。 30

【0022】

血管新生を阻害する小フィブロネクチンペプチドは、一般に、モチーフRGDを含む。RGDはインテグリン分子の認識とそれに結合するためにタンパク質によって用いられるペプチドモチーフ (アミノ酸Arg-Gly-Asp) である。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現は血管新生性血管に関連し、モノクローナル抗体によるその活性の阻害は血管新生を遮断する (Brooks et al., 1994, Science 264:569-571)。これは、RGDモチーフを含む環状ペプチドの投与がヒトロネクチン受容体型インテグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって確認されている (Hammes et al., 1996, Nature Medicine 2:529-533)。インテグリン・ブロッカー、例えば、環状ペプチド及びモノクローナル抗体の抗血管新生効果は、血管新生性血管のアポトーシスを誘導することにより腫瘍の退行を促進することが示されている (Brooks et al., 1994, Cell 79:1157-1164)。RGDモチーフ、及び他のインテグリン結合性モチーフNGR (アミノ酸Asn-Gln-Arg) を含むペプチドは顕著に強化された抗腫瘍活性を示した。 40

【0023】

別のタイプの細胞表面受容体、すなわち、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター 50

(uPA) 受容体の活性の阻害も血管新生の阻害を生じる。uPA 受容体は、リガンドの結合により、血管新生の基底膜浸潤工程に必要なタンパク分解カスケードを開始する。受容体アンタゴニストによる uPA 受容体の阻害は血管新生、腫瘍増殖 (Min, et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433) 及び転移 (Crowley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025) を阻害する。そのようなアンタゴニストは無作為ペプチドのバクテリオファージ・ペプチド表示によって同定されている (Goodson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7129-7133)。受容体のリガンド、uPA の優性ネガティブ形態も同定されている (Min et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433)。 10

[0024]

アンギオスタチン、エンドスタチン及び他の抗血管新生ペプチドの発見は癌治療の刺激的な新規アプローチをもたらしたものの、これらのペプチドを1つ以上を含む治療課程の実態は、ペプチドの大量産生の非現実性 (65 kg、すなわち143 lbの平均的な人物について、ペプチドによっては毎日約1.3又は6.5グラムのタンパク質を生成するコスト及び/又は労力から生じる) 及び治療の持続期間 (腫瘍を退行状態に留めるには持続しなければならない) である。これらのペプチドをそのように多量に投与しなければならない2つの主な理由は、第1に、大部分が血流中で分解し、第2に、分解を免れた分子のうち、非常に限定された部分のみが腫瘍まで到達する。したがって、抗血管新生タンパク質又はペプチドをより効率的に腫瘍部に、かつより対費用効果が高くて患者に優しい方法で送達することができれば、腫瘍治療の分野にとって非常に利点がある。 20

[0025]

2. 6. バクテリオシン・ファミリー

コリシン E3 (以下、ColE3 と呼ぶ) はバクテリオシン、すなわち、選択的活性を有するバクテリアタンパク質性毒素であり、その宿主はその毒素に対して免疫される。バクテリオシンは宿主ゲノム又はプラスミドによってコードされ得、広範な、もしくは狭い範囲の宿主を有することができ、かつ1つもしくは2つのサブユニットを含む単純構造又は多サブユニット構造を有することができる (Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144)。加えて、バクテリオシン宿主はバクテリオシンに対する免疫を有する。この免疫は、バクテリオシンを発現しないとしても、所定の宿主集団の全ての細胞において見いだされる。 30

[0026]

ColE3 の細胞傷害性はそのタンパク質合成の阻害から生じる (Nomura, 1963, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:315-324)。ColE3 活性の標的は細菌リボソームの16S成分 (これは、30S及び70Sリボソームに共通である) であり (Bowman et al., 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:964-968)、その活性はリボソームの分解を生じる (Meyhack, 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。ColE3 の活性はRNA分解酵素のうちで独特であり、RNAの全体的な分解は生じないが、mRNA分子を末端から49ヌクレオチドで開裂し、mRNAからのtRNAの分離と、それによる翻訳の阻害を生じる。ColE3 のリボヌクレアーゼ活性は、他のタンパク質が介在するのではなく、その分子それ自体にある (Saunders, 1978, Nature 274:113-114)。ColE3 は標的細胞の内膜及び外膜を通過することもできる。 40

[0027]

その天然形態において、ColE3 は1:1比の50 kDa及び10 kDaタンパク質からなる60 kDaタンパク質複合体であり、大きいサブユニットはヌクレアーゼ活性を有し、小さいサブユニットは50 kDaサブユニットの阻害機能を有する。したがって、50 kDaタンパク質は細胞傷害性タンパク質 (すなわち、毒素) として作用し、10 kDaタンパク質は抗毒素として作用する。50 kDaサブユニットは少なくとも2つの機能 50

(17)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

的ドメイン、標的細胞膜を横切つての転位に必要なN末端領域、及び触媒（RNA分解酵素）活性を有するC末端領域を含む。宿主生物内で、大サブユニットの活性は小サブユニットによって阻害される。これらのサブユニットは、その毒素が標的細胞内に侵入したときに、標的細胞の外膜との相互作用の結果として解離するものと考えられる（Konisky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144による総説）。

【0028】

ColE3の大サブユニットの毒性は微生物のうちでのクローン化遺伝子の外側拡散の防止に利用されている。Diazら（1994, *Mol. Microbiol.* 13: 855-861）は、ColE3のこれら2つの成分を、小（抗毒性）サブユニットが染色体に統合されたコーディング配列として発現し、大サブユニットがプラスミドから発現されるように分離した。染色体に組み込まれた小サブユニットを有する細菌はColE3大サブユニットを発現するプラスミドに対して免疫されているが、そのプラスミドが小サブユニットを欠く別のレシビエントに向けて外部に搬送された場合、その細胞は殺される。

【0029】

コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiska et al., 1979, *Experimentia* 35:406-407を参照）を含む哺乳動物細胞に対する大きな細胞傷害性効果を有することも示されている（Smarda, et al., 1978, *Folia Microbiol.* 23:272-277を参照）。ColE3の活性は80S哺乳動物リボソームの40Sサブユニットを標的とする（Tumowsky et al., 1973, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:327-334）。

【0030】

2. 7. 細菌の感染及び癌

初期の臨床観察で、細菌が感染した患者においてある種の癌が退行することが報告された症例が報告された。Nauts et al., 1953, *Acta Medica Scandinavica* 145:1-102, (Suppl. 276); 及び Shear, 1950, *J. A. M. A.* 142:383-390を参照のこと。これらの観察以来、Lee et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1847-1851 (Leeら) 及び Jones et al., 1992, *Infect. Immun.* 60:2475-2480 (Jonesら) は、*in vitro*で野生型株よりかなり多くの数がHEp-2（ヒト頬表皮癌腫）細胞に浸潤し得るサルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）の突然変異体を単離した。これらの「過剰浸潤性（hyperinvasive）」突然変異体は、HEp-2動物細胞に浸潤する野生型株の能力を通常は抑制する細菌の好気性増殖の条件下で単離した。しかしながら、Leeら及びJonesらによって記載されるような過剰浸潤性サルモネラ菌には汎浸潤性（pan-invasive）感染の危険性があり、癌患者に広範に広がる細菌感染につながる可能性がある。

【0031】

Carswell et al., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3669は、ウシ型弱毒結核菌ワクチン（*Bacillus Calmette-Guerin*）（BCG）を注射したマウスでTNFの血清濃度が増加し、TNF陽性血清がマウスにおいて肉腫Meth A及び他の移植腫瘍の壊死を生じたことを示した。このような観察の結果として、BCG注射での癌患者の免疫化が現在幾つかの癌治療プロトコルにおいて用いられている。BCG治療のレビューには、Snowski, 1994, *Compr. Ther.* 20:695-701; Barth and Morton, 1995, *Cancer* 75 (Suppl. 2):726-734; Friberg, 1993, *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.* 10:31-36を参照のこと。

【0032】

しかしながら、TNF- α 介在敗血症性ショックが細菌に関連する主な懸念のうちにあり、宿主にとって毒性もしくは致命的な結果を有する可能性がある (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; Dinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。さらに、TNF- α の用量制限性の全身毒性は有効な臨床使用の主要な障壁であった。TNF- α のレベルが毒性ではなく、治療用ベクターのより有効な濃度及び/又は持続期間を用いることができれば、この形態の免疫応答を低下させる改変は有用であろう。

【0033】

2. 8. 腫瘍標的細菌

遺伝子操作されたサルモネラが、腫瘍を標的とすることが可能であり、抗腫瘍活性を有し、かつ固形腫瘍へのエフェクター遺伝子、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV TK) の送達において有用であることが示されている (Pawelek et al., WO 96/40238)。

【0034】

2. 9. 改変細菌リピドAによるTNF- α の誘導の減少

TNF- α 産生の誘導が減少する結果として免疫応答を変化させる腫瘍標的細菌の脂質組成を改変することがPawelekら (Pawelek et al., WO 96/40238) によって示唆された。Pawelekらは、モノホスホリルリピドA (MLA) 産生の責を負うロードバクター (Rhodobacter) から遺伝子を単離するための方法を提供した。MLAは敗血症性ショックのアンタゴニストとして作用する。また、Pawelekらは、リピドA生合成における第3酵素UDP-3-O (R-30ヒドロキシルミリストイル) -グルコサミン-アシルトランスフェラーゼをコードする突然変異 *firA* (Kelley et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:19866-19874) を含む、リピドA生合成経路における遺伝子的改変の使用を提案した。Pawelekらは、*firA*遺伝子における突然変異が低レベルのTNF- α を誘導することを示した。

【0035】

大腸菌 (*Escherichia coli*) において、リピドAの末端ミリスチル化の原因である遺伝子 *msbB* (*mlt*) が同定されている (Engel, et al., 1992, J. Bacteriol. 174:6394-6403; Karow and Georgopoulos 1992, J. Bacteriol. 174:702-710; Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365)。この遺伝子の遺伝子的破壊は安定な無条件の突然変異を生じ、これはTNF- α の誘導を低下させる (Somerville et al., 1996, J. Clin. Invest. 97:359-365; Somerville, WO 97/25061)。しかしながら、これらの参考文献は、腫瘍標的サルモネラベクターにおける *msbB* 遺伝子の破壊が、病原性が低く、かつキレート剤に対してより感受性である細菌を生じるであろうことを示唆してはいない。

【0036】

細菌を遺伝子送達ベクターとして用いることに関連する問題は、正常哺乳動物細胞を直接殺す細菌の一般的な能力に加えて、宿主にとって毒性の結果を有するTNF- α を介して免疫系を過剰刺激するそれらの能力に集中している (Bone, 1992, JAMA 268:3452-3455; 及びDinarello et al., 1993, JAMA 269:1829-1835)。これらの要素に加えて、抗生物質に対する耐性は、ヒト体内での細菌の存在との対処を非常に複雑にする可能性がある (Tschape, 1996, D T W Dtsch Tierarztl Wochenschr 1996 103:273-7; Ramos et al., 1996, Enferm Infec. Microbiol. Clin. 14:345-51)。

【0037】

(19)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Hone and Powell, WO 97/18837 (「Hone及びPowell」) は、非発熱性リポドA又はLPSを有するグラム陰性細菌を産生する方法を開示している。

【0038】

Maskeil, WO 98/33923は、TNF α を野生型株と比較して低レベルで誘導するmsbB遺伝子内の突然変異を有するサルモネラの突然変異株を記載している。

【0039】

Bermudesら、WO 99/13053は、サルモネラにおけるmsbB遺伝子を遺伝子的に破壊するための組成物及び方法を教示し、これは、野生型と比較してTNF α を誘発する能力に劣り、かつ病原性が低いサルモネラを生じる。ある種の態様においては、幾つかのそのような突然変異体サルモネラは野生型サルモネラと比較してキレート剤に対する感受性を高めた。Low et al., 1999, Nature Biotech, 17:37-47も参照のこと。

【0040】

セクション2又は本願のあらゆるセクションにおけるあらゆる参考文献の引用又は同定は、そのような参考文献が本発明に対する従来技術として利用可能であることを承認するものであると解釈されるべきではない。

【0041】

3. 発明の概要

本発明は、固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法を提供する。一つの実施形態において、この方法は高レベルの1つ以上の一次エフェクター分子の送達を提供する。特に、本発明は、宿主に全身投与した場合には毒性であるか望ましくない作用（例えば、望ましくない免疫作用）を誘導しうる一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ（*Salmonella*）のような弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達する方法を提供する。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子を、適当な作用部位（例えば、固形腫瘍部位）に送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）の作製ならびに使用を包含する。詳細には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように遺伝子操作された通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

【0042】

本発明は、固形腫瘍の部位で一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に従うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。

【0043】

本発明の一次エフェクター分子は癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療するのに有用である。本明細書中で用いる「固形腫瘍の治療」または「固形腫瘍を治療する」とは、腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害すること、腫瘍の体積を縮小すること、腫瘍細胞を殺すこと、または腫瘍細胞の広がり（転移）を防止することを包含する。特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍部位で局所免疫応答を引き出して、結果的に腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害し、腫瘍細胞を死滅させ、または腫瘍細胞の他の身体部分への転移を防止する。したがって、一次エフェクター分子は腫瘍治療

(20)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

果をもたらす。

【0044】

一次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。本発明の一実施形態の好ましい様式において、一次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。この実施形態のより好ましい様式では、一次エフェクター分子はヒト由来のものである。本発明の一次エフェクター分子としては、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、腫瘍阻害酵素、およびこれらの機能性断片が挙げられる。

【0045】

特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバーまたはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α (リンホトキシン α)、LT- β (リンホトキシン β)、OX40L (OX40リガンド)、FasL、CD27L (CD27リガンド)、CD30L (CD30リガンド)、4-1BBL、APRIL (増殖誘導性リガンド)、LIGHT (活性化T細胞により産生される29kDaタイプII膜貫通タンパク質)、TL1 (腫瘍壊死因子様サイトカイン)、TNFSF16、TNFSF17、およびAITR-1 (活性化により誘導されるTNFRファミリーのメンバーのリガンド)がある。好ましい実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、およびCD40リガンド (CD40L)、またはこれらの機能性断片である。

【0046】

別の特定の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は抗血管新生因子またはその機能性断片である。抗血管新生因子の例として、制限するものではないが、エンドスタチン、アンジオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンIII、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびにインテグリン α 、 β 、およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストがある。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチン、アボミグレンまたはトロンボスポンジンIの機能性断片である。

【0047】

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチド、またはその機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプチドの例として、制限するものではないが、バクテリオシンファミリーのメンバー、ペロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、Pasteurella multocida毒素 (PMT)、Pseudomonas内毒素、ヘモリシン、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害剤であるCAAXテトラペプチド、サイクリン阻害剤、Rafキナーゼ阻害剤、CDCキナーゼ阻害剤、カスパーゼ、p53、p16およびp21がある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、バクテリオシンファミリーのメンバーはバクテリオシン放出タンパク質 (BRP) ではない。バクテリオシンファ

(21)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プナリシン7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、およびビプリオシンがある。特定の実施形態において、一次エフェクター分子はコリシンE3である。

【0048】

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍阻害酵素またはその機能性断片である。腫瘍阻害酵素の例として、制限するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ（ColE3を除く）、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼがある。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子はメチオナーゼである。

【0049】

本発明はまた、弱毒性腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）により固形腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子を局所組合せ送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒性腫瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子と1つの二次エフェクター分子をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒性腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態に従うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以上の弱毒性腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子と1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒性腫瘍標的細菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒性腫瘍標的細菌株が異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。

【0050】

本発明の二次エフェクター分子は、追加の抗腫瘍治療活性をもたらす、弱毒性一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達されて標的細菌からの一次エフェクター分子の放出を促進し、そして/または、作用部位（例えば、固形腫瘍の部位）での内在化を高める。本発明の二次エフェクター分子は、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療するために、一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達される分子（例えば、細胞毒素、酵素、バクテリオシンを含むがこれに限らない抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リポザイム、抗原など）からなる。

【0051】

二次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。特定の実施形態において、二次エフェクター分子は細菌またはウイルスに由来するものである。本発明のいくつかの好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は細菌由来のもの（例えば、BRP）である。本発明の他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子はウイルス由来のもの（例えば、TAT）である。本発明のさらに他の好ましい実施形態では、二次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。いくつかの好ましい実施形態において、二次エフェクター分子はヒト由来である。

【0052】

本発明は、プラスミドまたはトランスフェクトしうる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒性腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態において、弱毒性腫瘍標的細菌はサルモネラである。2つ以上のエフェクター分子（例えば、一次または二次）が弱毒性腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）において発現される場合、それらのエフェクター分子は同一のプラスミドまたは核酸によりコードされても、2つ以上のプラ

(22)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

スミドまたは核酸によりコードされてもよい。本発明はまた、細菌ゲノムに組み込まれる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。組み込まれるエフェクター分子は、弱毒化腫瘍標的細菌（例えば、サルモネラ）に対して内因性であってもよいし、また、（例えば、プラスミド、トランスフェクトしうる核酸、トランスポゾンのような、エフェクター分子をコードする核酸の導入により）弱毒化腫瘍標的細菌に導入されてもよい。結果的に、エフェクター分子をコードする核酸が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるようにする。本発明は、適切なプロモーターに機能的に連結されたエフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸に機能的に連結されるプロモーターは、同種（すなわち、天然）であっても異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸本来のものではない）であってもよい。適当なプロモーターの例としては、制限するものではないが、Tetプロモーター、trc、pepT、lac、sulA、pol II (dinA)、ruv、recA、uvrB、uvrD、umuDC、lexA、cea、caa、recN、およびpagCが挙げられる。

【0053】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌によりシグナル配列とエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、Omp様タンパク質またはその一部（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはそれらの組合せ；「Omp様タンパク質」の定義については下記の第3、1節を参照のこと）およびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。作用機構に関して制限されるものではないが、本発明は、Omp様タンパク質が外膜にエフェクター分子を固定もしくははつなぎ止める働きをしているか、細菌外膜にエフェクター分子を局在させるように働く、と考えられる。いくつかの実施形態において、エフェクター分子は細菌外膜への送達が増加される。ある実施形態では、Omp様タンパク質にエフェクター分子を融合させることで、エフェクター分子の周辺細胞質への局在が増加される。Omp様タンパク質の例として、制限するものではないが、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ボーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、lamB、 β -ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、および主要外膜リポタンパク質（例えば、LLP）のそれぞれの少なくとも一部が挙げられる。本発明の他の実施形態では、本発明の融合タンパク質はタンパク質分解切断部位を含む。このタンパク質分解切断部位はエフェクター分子またはOmp様タンパク質に内因性のものであってもよく、あるいはタンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。

【0054】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。融合タンパク質中で用いるフェリーペプチドは、その生産または導入の拡散範囲内のほぼすべての細胞への目的のポリペプチドまたはペプチドの送達を促進することが分かっている（例えば、Bayley, 1999, Nature Biotechnology 17: 1066-1067; Fernandezら, 1998, Nature Biotechnology 16: 418-420; Derossiら, 1998, Trends Cell Biol. 8: 84-87を参照のこと）。したがって、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作することは、腫瘍細胞に内在化されるエフェクター分子の能力を高める。特定の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つの融合タンパク質をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。

(23)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

これらの実施形態によれば、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。フェリーペプチドの例として、制限するものではないが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン（ペネトラキシン）、カポジ繊維芽細胞増殖因子（FGF）膜移行性配列（MTS）、および単純ヘルペスウイルスVP22がある。

【0055】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列とフェリーペプチドとエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。 19

【0056】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子でありうる。

【0057】

いくつかの実施形態では、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。いくつかの他の実施形態では、2つ以上の弱毒化腫瘍標的細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。これらの実施形態の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は同一種のものである。これらの実施形態の別の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は異なる種（例えば、リステリア属とサルモネラ属）のものである。 20

【0058】

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位に本発明の1つ以上の融合タンパク質および本発明の1つ以上のエフェクター分子を局所送達するための方法を提供する。好ましくは、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位で融合タンパク質とエフェクター分子の両方が発現されると、融合タンパク質のみまたはエフェクター分子のみが発現される場合に比べて、腫瘍または腫瘍細胞の増殖の阻害されるレベルが向上する。 30

【0059】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における一次エフェクター分子および場合により二次エフェクター分子の発現を提供する。本発明の好ましい実施形態において、高められた放出は弱毒化腫瘍標的細菌による放出因子の発現と関係する。一つの実施形態では、かかる放出により細胞質または細胞周辺腔からのエフェクター分子の放出が増大する。放出因子は弱毒化腫瘍標的細菌に内因性のものであっても、外因性のもの（すなわち、弱毒化腫瘍標的細菌には本来存在しない核酸分子によりコードされるもの）であってもよい。放出因子はプラスミドからなる核酸によってコードされてもよいし、弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれる核酸によってコードされてもよい。放出因子は一次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。放出因子は二次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラスミドでコードされ得る。好ましい実施形態において、放出因子はバクテリオシン放出タンパク質（BRP）である。特定の実施形態において、BRPはクロアシンDF13プラスミドのもの、コリシンE1～E9プラスミドのもの、またはコリシンA、NまたはDプラスミドのものである。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13のもの（pC10DF13 BRP）である。本発明の別の実施形態では、高められた放出系はポー 50

(24)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

リンタンパク質の過剰発現を含む。

【0060】

本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における本発明の融合タンパク質の発現を提供する。特定の実施形態において、放出因子はOmp様タンパク質に融合された一次エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現する細胞において発現される。この実施形態では、放出因子の共発現が細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を高める。

【0061】

一つの実施形態において、本発明は、エフェクター分子または融合タンパク質を発現しながら腫瘍内に選択的に蓄積する、改変された弱毒化腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルのエフェクター分子または融合タンパク質を送達するための方法を提供する。特定の様式において、改変された弱毒化腫瘍標的細菌株は腫瘍内でエフェクター分子を選択的に増幅する。以下の分節の教示内容は、単純化するために、特にサルモネラに関して述べるが、本発明の組成物および方法は、いかなる場合も、サルモネラに限定されるものではなく、その教示内容が当てはまる他のあらゆる細菌を包含するものである。特定的には、本発明は通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。弱毒化腫瘍標的細菌の例として、制限するものではないが、大腸菌（腸侵入性大腸菌を含む）、*Salmonella* spp.、*Shigella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Listeria monocytogenes*、*Mycoplasma hominis*、および*Streptococcus* spp.が挙げられる。

【0062】

本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。本発明はさらに、製薬上許容される担体と、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および／または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラである。

【0063】

本発明の医薬組成物は固形腫瘍の治療に有用である。固形腫瘍には、肉腫、癌腫、リンパ腫、その他の固形腫瘍癌（例えば、生殖細胞系の腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーマ、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、中皮腫）が含まれるが、これらに限らない。

【0064】

本発明は、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは

(25)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。さらに、本発明は、同形腫瘍癌の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子（すなわち、一次および/または二次分子）をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラである。特定の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌が高められた放出系を含む。

【0065】

いくつかの実施形態においては、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、他の公知の癌治療法と共に使用することができる。例えば、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、化学療法剤と共に用いられる。化学療法剤の例として、制限するものではないが、シスプラチン、イホスファミド (ifosfamide)、パクリタキソール、タキサン類、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211）、ゲムシタビン (gemcitabine)、ビノレルビン (vinorelbine)、オキサリプラチン (oxaliplatin)、5-フルオロウラシル (5-FU)、レウコボリン (leucovorin)、ビノレルビン (vinorelbine)、テモダール (temodal)、タキソール、サイトカラシン (cytochalasin) B、グラミシジンD、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、メルファラン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビューロマイシン同族体、ならびにサイトキサンが挙げられる。あるいはまた、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、放射線療法と共に用いられる。

【0066】

本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の連続的または並行投与を含む。本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の相加的または相乗的組合せを包含する。

【0067】

本発明はまた、作用部位がそれぞれ異なっている、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の組合せを包含する。そのような組合せは、その組合せが相加的であろうと相乗的であろうと、これらの治療薬の二重作用に基づく向上した治療を提供する。したがって、本発明の新規組合せ療法は、単一薬剤療法として用いられるいずれか一方の薬剤と比べて、向上した効力をもたらす。

【0068】

3. 1. 定義と略語

本明細書で用いる用語「サルモネラ」とは、チフス菌、ブタコレラ菌、および腸炎菌等のすべてのサルモネラ種を包含する。また、例えば、腸炎菌の亜群であり、一般にネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) と呼ばれる、ネズミチフス菌等のサルモネラの血清型も含まれる。

【0069】

(26)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

類似体： 本明細書で用いる用語「類似体」は、一次または二次エフェクター分子として類似または同一の機能を有するが、一次または二次エフェクター分子の類似または同一のアミノ酸配列を必ずしも含まない、あるいは、一次または二次エフェクター分子の類似または同一の構造を必ずしも有していないポリペプチドを意味する。類似アミノ酸配列を含むポリペプチドとは、下記事項の少なくとも1つを満たすポリペプチドを意味する：(a) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列に対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド；(b) 少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、または少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド；(c) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド。本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した構造を有するポリペプチドとは、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した二次、三次または四次構造を有するポリペプチドを意味する。ポリペプチドの構造は、当業者には公知の方法により決定することができ、このような方法として、限定するものではないが、ペプチド配列決定、X線結晶検査、核磁気共鳴、円二色性、結晶電子顕微鏡検査法が挙げられる。

【0070】

抗血管新生因子： 抗血管新生因子は、抗血管新生活性を有するタンパク質性分子、あるいは、このようなタンパク質性分子をコードする核酸である。好ましい実施形態では、抗血管新生因子は、ペプチド断片、またはこれより大きいタンパク質の切断断片である。

【0071】

弱毒化： 弱毒化は、微生物またはベクターの病原性が弱まるような改変である。弱毒化が目的とする結果は、上記微生物またはベクターを患者に投与したとき、毒性や他の副作用等の危険性が低減することである。

【0072】

バクテリオシン： バクテリオシンは、細菌の宿主が毒素に対して免疫性であるという点で、選択的活性を有する細菌タンパク質性毒素である。バクテリオシンは、細菌の宿主ゲノムまたはプラスミドによりコードされ、広いもしくは狭い範囲の他の細菌に対して毒性であり、1つまたは2つのサブユニットからなる単純な構造であるか、あるいは、多サブユニット構造である。さらに、バクテリオシンを発現する宿主は、該バクテリオシンに対する免疫を有する。

【0073】

キレート剤感受性： キレート剤感受性は、細菌の増殖が影響を受ける有効濃度として定義されるか、または、回収可能なコロニー形成単位(c.f.u.)によって決定されるような、細菌の生存能力が低下する濃度として定義される。

【0074】

(27)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

誘導体： 本明細書において、「ポリペプチドの誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」とは、アミノ酸残基の置換、欠失もしくは付加の導入、またはあらゆるタイプの分子のポリペプチドへの共有結合により、改変された一次または二次エフェクター分子のようなポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本明細書において、「一次または二次エフェクター分子の誘導体」という表現で用いられる用語「誘導体」は、例えば、あらゆるタイプの分子の上記一次または二次エフェクター分子への共有結合により、そのように修飾された一次または二次エフェクター分子を意味する。例えば、限定するものではないが、一次または二次エフェクター分子は、例えば、タンパク質分解切断、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結等により、修飾することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体は、当業者には公知の技法を用いた化学的修飾（例えば、アシル化、リン酸化、カルボキシル化、グルコシル化、セレン修飾および硫酸化）により修飾することができる。さらに、一次または二次エフェクター分子の誘導体は、1個以上の非古典的アミノ酸を含んでいてもよい。ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似または同一の機能を有する。本明細書において、「msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体」という表現で用いる用語「誘導体」は、国際公開番号WO 99/13053（本明細書に、参照により全文が組み込まれる）の第17頁に定義された修飾msbB⁻サルモネラ突然変異体を意味する。

【0075】

断片： 本明細書で用いる用語「断片」とは、一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列の少なくとも2個連続したアミノ酸残基、少なくとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少なくとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、少なくとも175個連続したアミノ酸残基の、少なくとも200個連続したアミノ酸残基の、もしくは少なくとも250個連続したアミノ酸残基の、アミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

【0076】

機能性断片： 本明細書で用いる用語「機能性断片」とは、上記一次または二次エフェクター分子の少なくとも1つの機能（例えば、エフェクター分子の酵素活性、抗血管新生活性、もしくは抗腫瘍活性等）を保持する一次または二次エフェクター分子の断片を意味する。

【0077】

融合タンパク質： 一次もしくは二次エフェクター分子のアミノ酸配列、またはその機能性断片もしくは誘導体と、異種ポリペプチド（例えば、非一次または非二次エフェクター分子）のアミノ酸配列と、を含むポリペプチドを意味する。

【0078】

Omp様タンパク質： 本明細書で用いる用語「Omp様タンパク質」とは、あらゆる細菌の外膜タンパク質またはその一部分（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはこれらの組合せ）を意味する。具体的態様では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ボーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、 β -ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン結合リポタンパク質（PAL）、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、または主要な外膜リポタンパク質（例えばLLP）等の少なくとも一部分である。

【0079】

精製された： 本明細書で用いる「精製された」弱毒化腫瘍標的細菌株は、混入タンパク質またはアミノ酸（例えば、死滅した細菌からの残屑）または培地を実質的に含まない。

(28)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

混入タンパク質またはアミノ酸を実質的に含まない弱毒化腫瘍標的細菌株はまた、約30%、20%、10%、もしくは5%（乾燥重量基準）以下の混入タンパク質またはアミノ酸を含む弱毒化腫瘍標的細菌も意味する。

【0080】

放出因子： 本明細書で用いる放出因子は、細菌成分の放出を増強するあらゆるタンパク質またはその一部分を意味する。一実施形態では、放出因子は、バクテリオシン放出タンパク質である。放出因子としては、限定するものではないが、クロアシンD13プラスミドによってコードされるバクテリオシン放出タンパク質（BRP）、コリシンE1～E9プラスミドによりコードされるBRP、あるいは、コリシンA、NまたはDプラスミドによりによりコードされるBRPが挙げられる。

16

【0081】

敗血症性ショック： 敗血症性ショックは、TNF- α により開始される複合サイトカインカスケードによる内部臓器不全の状態である。微生物またはバクテリアがTNF- α を誘導する相対能力は、敗血症性ショックを誘導するその相対能力を示す1つの基準として用いられる。

【0082】

腫瘍標的（tumor-targeted）： 腫瘍標的とは、非癌性の対応細胞または組織に比べて、癌性の標的細胞または組織に優先的に局在化し、複製する能力として定義される。従って、サルモネラのような腫瘍標的細菌は、癌性の標的細胞または腫瘍環境に優先的に結合し、感染し、かつ／または依然として生存可能である。

20

【0083】

毒力： 毒力は、疾病を引き起こす一般的能力を表す相対語であり、正常細胞を死滅させる能力、または敗血症性ショック（以下の具体的定義を参照）を誘導する能力が含まれる。

【0084】

本明細書において、株の名称VNP20009（国際公開番号WO99/13053）、YS1646および41.2.9は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202165が与えられた株を指す。株の名称YS1456および8.7は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Culture Collectionに寄託され、受託番号202164が与えられた株を指す。

30

【0085】

本発明は、以下に行う詳細な説明、具体的実施形態の例示、および添付の図面を参照することにより、さらによく理解されるであろう。

【0086】

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については本明細書の最後を参照のこと。

【0087】

5. 本発明の詳細な説明

本発明は、弱毒化腫瘍標的細菌株を用いて、高レベルの治療用一次エフェクター分子を腫瘍に送達するものである。本発明は、所定の一次エフェクター分子の潜在的全身性毒性（例えば、TNF- α によって起こる敗血症性ショック）を回避するという利点をもたらす。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を固形腫瘍に送達する。さらに具体的には、本発明は、適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の部位への、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を送達するためのバクテリアとして、例えば、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌を調製および使用することを包含する。具体的には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌であり、これらは、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように操作されている。

50

(29)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0088】

ここに記載される弱毒化腫瘍標的細菌に基づく送達系は、固形腫瘍の部位への1つ以上のエフェクター分子の局所送達を提供する。本発明は、宿主に全身投与する場合には、毒性でありうる、または望ましくない副作用（例えば、望ましくない免疫作用）を誘導する恐れがある一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌によって腫瘍に局所送達することができる、安全かつ効果的な方法を提供する。本発明はまた、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子の組合せ送達を提供する。さらに本発明は、1つ以上の異なる一次エフェクター分子、および場合に応じて、1つ以上の異なる二次エフェクター分子を保有する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組合せ送達を提供する。 15

【0089】

また、本発明は、固形腫瘍の部位で該融合タンパク質を発現させるように操作された弱毒化腫瘍標的細菌によって、エフェクター分子を含む1つ以上の融合タンパク質を局所送達する方法を提供する。一実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。さらに別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。さらにまた別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切断部位と、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現させるように操作される。弱毒化腫瘍標的細菌は、本発明の1つ以上の融合タンパク質と、本発明の1つ以上のエフェクター分子を発現させるように操作される。 20

【0090】

本発明はまた、製薬上許容される担体と、1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物も提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を提供する。 30

【0091】

本発明は、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を、治療を要する動物に投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。さらに、本発明は、動物における固形腫瘍を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法を提供する。好ましくは、上記動物は、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、サル、またはブタ）であり、さらに好ましくは、動物はヒトである。固形腫瘍の例として、限定するものではないが、肉腫、癌腫、リンパ腫が挙げられ、その他の固形腫瘍として、限定するものではないが、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーマ、脾臓癌、胃癌、肝臓癌 50

(30)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

、大腸癌、中枢神経系の癌、生殖細胞系の癌、腎臓癌、膀胱癌、および中皮種が挙げられる。

【0092】

特定の作用機構に制限する意図はないが、本発明者らは、本発明に従い、エフェクター分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌ベクターの送達によって、腫瘍の部位にエフェクター分子の標的発現が達成されると考える。

【0093】

明瞭にするため、詳細な説明を次の小節に分けるものとする：細菌ベクター；腫瘍治療のための一次エフェクター分子；一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子；誘導体と類似体；融合タンパク質；発現ベクター；ならびに、送達のための方法および組成物。

【0094】

5. 1. 細菌ベクター

本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いることができる。さらに具体的には、本発明の方法で用いられる弱毒化腫瘍標的細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。本発明の方法で用いられる、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌の例としては、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種 (*Salmonella* spp.)、赤痢菌種 (*Shigella* spp.)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、単球症リステリア (*Listeria monocytogenes*)、ヒトマイコプラズマ (*Mycoplasma hominis*)、およびレンサ球菌種 (*Streptococcus* spp.) が挙げられる。

【0095】

弱毒化および腫瘍ターゲティングに寄与する因子を本明細書に記載するが、これらを用いて、本発明の方法で使用する好適な細菌株を構築または選択することができる。例えば、腫瘍標的細菌を選択および単離する方法については、国際公開番号W096/40238の第6. 1節に記載され、また、細菌を弱毒化する方法については、同第6. 2節に記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に全文を組み込むものとする。弱毒化腫瘍標的細菌の例は、国際出願W099/13053（参照により本明細書に全文を組み込む）にも記載されている。本発明の特定の実施形態では、当業者には公知の方法で細菌を修飾することにより、弱毒化または高度に弱毒化することができる。

【0096】

本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、腫瘍阻害酵素、もしくは抗血管新生因子）を単独で、または1つ以上の二次エフェクター分子と組み合わせて送達するベクターとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はまた、1つ以上の本発明の融合タンパク質を単独で、または1つ以上のエフェクター分子と組み合わせて送達するベクターとして、弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、エフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、サルモネラである。

【0097】

以下の節では、特にサルモネラに関して教示するが、本発明の組成物および方法は、何らサルモネラに限定されるわけではなく、教示が適用するあらゆる他の細菌を包含する。適した細菌種として、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種、赤痢菌種、エルシニアエンテロコリチカ、単球症リステリア、ヒトマイコプラズマ、およびレンサ球菌種が挙げられ、ここで、該細菌は、通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

【0098】

5. 1. 1 サルモネラベクター

本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、1つ以上の一次エフェク

(31)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。さらに、本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を修飾して、本発明1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、本発明の1つ以上のエフェクター分子をコードすることにより、本発明の融合タンパク質およびエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製することができる。

【0099】

サルモネラ等の細菌は、ヒトおよび動物の疾病を引き起こす病原体である。サルモネラによって発生し得る疾病の1つは、敗血症であり、これは、敗血症性ショックの発作に関連する高い死亡率 (Bone, 1993, *Clinical Microbiol. Revs.* 6:57-68) のために、深刻な問題である。従って、本発明で、サルモネラバクターを安全に使用できるようにするためには、サルモネラ等の細菌バクターの病原性を低減 (弱毒化) する。本発明では、弱毒化は、微生物バクターを修飾することにより、該微生物バクターの病原性を低減するという従来の定義に加えて、微生物バクターを修飾することにより、低力価の該誘導微生物バクターを患者に投与し、それでも尚、高力価の親微生物バクターを投与したのと同等の結果を達成できるようにすることも含む。その結果、バクターを患者に投与したことによる毒性ショックまたはその他の副作用の危険性を低下させることができる。このように弱毒化された細菌は、多数の技法により単離される。例えば、宿主細胞、特にマクロファージおよび好中球内での細菌の生存を確実にするビルレンス (virulence) 因子をコードするDNA配列の欠失または破壊により、弱毒化を達成することができる。このような欠失または破壊技法は、当業者には公知であり、例えば、相同的組換え、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発、もしくはトランスポゾン突然変異誘発が挙げられる。マクロファージ内での生存に関連するビルレンス因子は、例えば、酸性化のようなストレスシグナルに応答して、またはマクロピノサイトシス等の宿主細胞防御機構に応答して、通常、マクロファージ内で特異的に発現される (Fieldsら、1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5189-5193)。国際公開番号WO96/40238の表4には、欠失によって弱毒化が起こるサルモネラ・ビルレンス因子が例示的に列挙されている。

【0100】

サルモネラのような細菌バクターの弱毒化の別の方法は、細菌の毒性の原因となる細菌の置換基を修飾するものである。例えば、リポ多糖 (LPS) または内毒素は、細菌性敗血症の病理作用の主な原因である。この応答を起こすLPSの成分は、リビドA (「LA」) である。LAの毒性作用の排除または軽減により、1) 患者における敗血症性ショックの危険性が低下すると共に、2) さらに高レベルの細菌バクターを許容できることから、弱毒化細菌が得られる。

【0101】

サルモネラのような細菌のLA含有率の改変は、LPS生合成経路に突然変異を導入することにより達成することができる。LPS生合成におけるいくつかの酵素段階、およびサルモネラ内でそれらを制御する遺伝子座、ならびに対応する突然変異体が確認されている (Raetz, 1993, *J. Bacteriol.* 175:5745-5753およびその中の参考文献)。このような突然変異体の一例として、firAがあるが、これは、酵素UDP-3-O (R-30ヒドロキシミリストイル)-グリコシアミンN-アシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子内の突然変異であり、該酵素は、内毒素生合成における第3段階を調節する (Kelleyら、1993, *J. Biol. Chem.* 268:19866-19874)。このタイプの突然変異を担持する細菌株はリビドAを生産するが、これは第7脂肪酸、すなわちヘキサデカン酸、を含むという点で野生型リビドAとは異なる (RoyおよびColeman, 1994, *J. Bacteriol.* 176:1639-1646)。RoyおよびColemanは、内毒素生合成における第3段階の遮断のほかに、firA⁻突然変異は、リビドA生合成の第6段階を

(32)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

調節するリポドA 4' キナーゼの酵素活性を低下させることも明らかにした。

【0102】

弱毒化に加えて、本発明の細菌バクテリウムは腫瘍ターゲティングされる。すなわち、細菌は、正常組織、非腫瘍または非腫瘍細胞に対して、腫瘍または腫瘍細胞に優先的に結合し、感染し、かつ／または依然として生存可能である。弱毒化腫瘍標的細菌を取得するのに適した方法は、国際公開WO96/40238の第6、1節（第25～32頁；腫瘍ターゲティング）および第6、2、2節（第43～51頁；弱毒化）に記載されており、該文献は、参照により本発明に組み込まれるものとする。こうして得られるバクテリウムは高度に特異的で、かつ重感染性であることから、標的腫瘍または腫瘍細胞に存在する感染細菌の数と、非癌性対応部でのそれとの差は、微生物培養物の希釈度が増加するほど大きくなるため、これまでより低力価の微生物バクテリウムを用いて、正の結果を得ることができる。また、国際公開WO96/40238に記載される技法を用いて、弱毒化腫瘍標的サルモネラまたは非サルモネラ細菌バクテリウムを作製することも可能である。

【0103】

LSP経路突然変異を有する弱毒化腫瘍標的細菌の一例が、国際公開WO99/13053に記載されたmsbB⁻サルモネラ突然変異体である。尚、該文献は、参照により本明細書に組み込むものとする。特に、msbB⁻サルモネラ突然変異体の特徴について説明する第6、1、2節を参照されたい。msbB⁻サルモネラの1つの特徴は、野生型細菌バクテリウムと比較して、TNF- α 応答を誘導する能力が低下していることである。msbB⁻サルモネラは、野生型細菌バクテリウムの誘導レベルと比較して、約5%から約40%のレベルでTNF- α 発現を誘導する。

【0104】

全細菌または単離もしくは精製されたLPSにより誘導されるTNF- α 応答は、固相酵素免疫検定法（ELISA）等、市販のアッセイ装置を用いて、*in vitro*または*in vivo*で評価することができる。コロニー形成単位（c. f. u.）当たりの、または $\mu\text{g}/\text{kg}$ に基づくTNF- α 生産の比較を用いて、相対活性を決定する。単位当たりのTNF- α レベルが低いほど、TNF- α 生産の誘導が減少していることを示す。好ましい実施形態では、msbB⁻サルモネラバクテリウムを修飾して、本発明の1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を含むようにする。

【0105】

本発明はまた、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体の使用も包含する。本発明の教示に従い、msbB⁻弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体を修飾し、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の腫瘍標的細菌を作製することができる。

【0106】

患者への治療の過程で、さらに毒性の高い表現型に復帰しないような、弱毒化表現型の安定性は重要である。このような安定性は、例えば、ビルレンス遺伝子が、エピスタシス的（epistatically）ではなく、欠失または染色体レベルでのその他の非復帰突然変異によって破壊されるように備えることにより、獲得することができる。

【0107】

弱毒化表現型を安全にする別の方法は、例えば、msbB⁻突然変異（国際公開WO99/13053）のように、リポドA生産用の経路における突然変異や、Bochner, 1980, J. Bacteriol. 143:926-933により記載されたウラシル生合成、プリン生合成、およびアルギニン生合成のように、1以上の栄養素または代謝物の栄養要求性突然変異体への1以上の突然変異等、1以上の方法で弱毒化されるように、細菌を操作することである。好ましい実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードまたは発現する腫瘍標的msbB⁻サルモネラもまた、プリンに対して栄養要求性である。特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコー

(33)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ドまたは発現する弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、PurIまたはSerCにおける突然変異の存在によって、弱毒化される。他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコードする弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、PurIまたはSerCにおける欠失の存在によって、弱毒化される。

[0108]

従って、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現し、固形腫瘍癌に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現するように構築する。さらに、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現し、固形腫瘍癌に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現するように構築する。

[0109]

5. 2. 腫瘍治療のための一次エフェクター分子

本発明は、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌による、一次（および場合に応じて、二次）エフェクター分子の送達を達成する。本発明のエフェクター分子は、タンパク質性分子（例えば、タンパク質（限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質等を含む））である。本発明はさらに、本発明の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。

[0110]

一次エフェクター分子は、あらゆる公知の生物、例えば、限定するものではないが、動物、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルス等に由来するものでよい。本発明の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、哺乳動物に由来する。さらに好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ヒトに由来する。本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、腫瘍阻害酵素、ならびに、これらの機能性断片を含む。

[0111]

具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバーまたはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例としては、限定するものではないが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT- α 、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF16、TNFSF17およびAITR-Lが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、もしくはこれらの機能性断片である。これらについて詳しくは、例えば、TNFファミリーのメンバーを記載したKwon, B.ら、1999, Curr. Opin. Immunol. 11:340-345を参照されたい。また、以下の表1は、TNFファミリーのメンバー例の古典的名称および標準化された名称の一覧を示す。本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF- α 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE)、TNF- α 関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、もしくはCD40リガンド (CD40L) である。

(34)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0112】

【表1】

TNF ファミリーのメンバー	
古典的名称	標準化された名称
LT- α	TNFSF1
TNF- α	TNFSF2
LT- β	TNFSF3
OX40L	TNFSF4
CD40L	TNFSF5
F _{as} L	TNFSF6
CD27L	TNFSF7
CD30L	TNFSF8
4-1BBL	TNFSF9
TRAIL	TNFSF10
TRANCE	TNFSF11
TWEAK	TNFSF12
APRIL	TNFSF13
LIGHT	TNFSF14
TL1	TNFSF15
---	TNFSF16
---	TNFSF17
AITR-L	TNFSF18

【0113】

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、抗血管新生因子もしくはその機能性断片である。抗血管新生因子の例として、限定するものではないが、エンドスタチン、アンギオスタチン、アポミグレン、抗血管新生抗トロンビンIII、フィブロネクチンの29 kDa N末端および40 kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体アンタゴニスト、プロラクチンの16 kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7, 8 kDaタンパク質分解断片、13, 40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGR含有ペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンおよびEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびに、インテグリン α , β , およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストが挙げられる。

【0114】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチンである。天然のエンドスタチンは、コラーゲンXVIIのC末端の約180アミノ酸からなる(コラーゲンXVIIの2つのスプライス形態をコードするcDNAは、Genbank登録番号AF1801およびAF18082を有する)。

【0115】

(35)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、プラスミノーゲン断片である（プラスミノーゲンのコード配列は、Genbank登録番号NM-000301およびA33096）にみいだすことができる）。アンギオスタチンペプチドは、言うまでもなく、プラスミノーゲンの4つのクリングルドメイン、すなわち、クリングル1〜クリングル4を含む。組換えクリングル1、2および3は、天然ペプチドの抗血管新生特性を有するのに対し、クリングル4にはそのような活性がない（Caoら、1996、*J. Biol. Chem.* 271:29461-29567）。従って、本発明のアンギオスタチンエフェクター分子は、クリングル1、クリングル2およびクリングル3からなる群より選択される少なくとも1つの、好ましくは、1つ以上のクリングルドメインを含む。具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、40 kDaイソ型、42 kDaイソ型、45 kDaイソ型、またはこれらの組合せからなる群より選択されるヒトアンギオスタチン分子である。別の実施形態では、該一次エフェクター分子は、プラスミノーゲンのクリングル5ドメインであり、これは、アンギオスタチン（アンギオスタチンはクリングルドメイン1〜4からなる）より強力な血管新生阻害物質である。

[0116]

別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、アンチトロニンIIIである。アンチトロニンIIIは、以後アンチトロピンと呼び、これは、タンパク質を血管壁に連結するヘパリン結合ドメインと、トロピンと相互作用する活性部位ループとを含む。アンチトロピンをヘパリンと結合させると、タンパク質はコンホメーション変化を引き起こし、これによって、活性ループがトロピンと相互作用し、その結果、トロピンによる該ループのタンパク質分解切断が起こる。タンパク質分解切断事象により、アンチトロピンのコンホメーションにさらに別の変化が起こり、これによって（i）トロピンとアンチトロピンとの間の相互作用界面が改変され、（ii）ヘパリンから複合体が放出される（Carrell、1999、*Science* 285:1861-1862、およびその中の参考文献）。O'Reillyら（1999、*Science* 285:1926-1928）は、切断されたアンチトロピンが、強力な抗血管新生活性を有することをみいだした。従って、一実施形態では、本発明の抗血管新生因子は、抗血管新生形態のアンチトロピンである。本発明の方法に従う固形腫瘍への上記タンパク質の送達のために、細菌ベクターを修飾し、全長アンチトロピンGenbank登録番号NM-000488およびアンチトロピンの切断を触媒するタンパク質分解酵素を発現させることにより、抗血管新生形態のタンパク質を生成する。タンパク質分解酵素は、トロピン、腫瘍エラスターゼ、およびヒト好中球エラスターゼからなる群より選択される。好ましい実施形態では、タンパク質分解酵素は腫瘍エラスターゼである。機能性腫瘍エラスターゼの組換え発現の方法は、Shirasuにより教示されている（Shirasuら、1987、*J. Biochem.* 102:1555-1563）。

[0117]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDaタンパク質分解断片である。これら断片の発現ベクターは、フィブロネクチン前駆体タンパク質をコードする全長核酸配列（Genbank登録番号X02761）、およびコードされたタンパク質の成熟化についての記載事項（description）を用いた標準的方法により生成することができる。好ましい実施形態では、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDa断片は、例えば、pTrec99Aプラスミドへの挿入により、trecプロモーターの制御下で細胞質タンパク質として発現させる。

[0118]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（uPA）受容体のアンタゴニストである。実施形態の一態様では、該アンタゴニストは、uPAのドミナントネガティブ突然変異体である（例えば、Crowleyら、1993、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5021-5025）。実施形態の別の態様では、アンタゴニストは、ペプチドアンタゴニスト

(36)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

トまたはその融合タンパク質である (Goodsonら、1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7129-7133)。実施形態のさらに別の態様では、アンタゴニストは、ドミナントネガティブ可溶性uPA受容体である (Minら、1996, *Cancer Res.* 56:2428-2433)。

【0119】

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、約120のアミノ酸からなる、プロラクチンの16 kDa N末端断片、またはその生物学的に活性な断片である (プロラクチンのコード配列は、Genbank登録番号NM-000948にみいだすことができる)。具体的実施形態では、上記プロラクチン断片は、ジスルフィド結合によるタンパク質の不要な架橋を回避するため、Cys58→Ser58突然変異を有する。 19

【0120】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、7.8 kDa 血小板第4因子断片である。具体的実施形態では、7.8 kDa 血小板第4因子断片は、融合タンパク質として発現され、該融合タンパク質において、アミノ末端は、大腸菌βグルクロニダーゼの最初の35アミノ酸からなる。別の実施形態では、血小板第4因子のヘパリン結合性リシンをグルタミン酸残基に突然変異させることにより、強力な抗血管新生活性を有する変異型タンパク質が得られる (Maioneら、1991, *Cancer Res.* 51:2077-2083)。血小板第4因子のコード配列は、Genbank登録番号NM-002619である。

【0121】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、血小板第4因子の抗血管新生13アミノ酸断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンボスポジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 、 β 、もしくはVEGF受容体の小さいペプチドアンタゴニストに相当する小さなペプチドである。具体的実施形態では、小さいペプチドをタンデムに発現させることにより、タンパク質安定性が高まる。小さいペプチドの配列は、VEGF受容体アンタゴニスト (Sokerら、1993, *J. Biol. Chem.* 272:31582-31588)を除いて、Cao (1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:161-176)により提供されている。極めて好ましい実施形態では、小さいペプチドは、RGDまたはNGRモチーフを含む。この実施形態の特定の様式では、RGDまたはNGRモチーフを含むペプチドは、例えば、OmpAの1つ以上の細胞外ループをコードする核酸と、読み枠を合わせて該ペプチドをコードする核酸を融合することにより、宿主細菌の細胞表面上に提示される。 30

【0122】

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチド、もしくはそれらの機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドは、例えば、タンパク質合成の干渉または細胞周期の破壊を介して、細胞増殖を阻害することにより、細胞に対して毒性を有するか、または細胞分裂を抑制する。このような物質は、rRNAまたはリボ核タンパク質を切断するか、伸長因子を阻害するか、mRNAを切断することにより、あるいは、タンパク質合成を、細胞が生存できないようなレベルにまで低下させるその他の機構によって、作用すると考えられる。 40

【0123】

細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドの例として、限定するものではないが、下記のもの挙げられる：バクテリオシンファミリーのメンバー、ペロ毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1；例えば、大腸菌CNF1および*Vibrio fischeri* CNF1)、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2)、*Pasteurella multocida* 毒素 (PMT)、溶血素、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害物質であるCAA Xテトラペプチド、サポリン、リシン、アブリン、その他のリボソーム不活性化タンパク質 (RIP)、シュードモナス外毒素、DNA、RNAまたはタンパク質合成の 50

(37)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

阻害剤、アンチセンス核酸、その他の代謝阻害物質（例えば、DNアーゼおよびリボヌクレアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ等のDNAまたはRNA切断分子）、プロドラッグ変換酵素（例えば、HSV由来のチミジンキナーゼおよび細菌シトシンデアミナーゼ）、光活性化ポルフィリン、リシン、リシンA鎖、トウモロコシRIP、ゲロニン、細胞致死拡大（cytotoxic distending）毒素、ジフテリア毒素、ジフテリア毒素A鎖、トリコサンチン、トリチン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、ミラビリス（mirabilis）抗ウイルスタンパク質（MAP）、ジアンテン32および30、アブリン、モノドリン、ブリオジン、志賀毒素（shiga）、キュウリの種子からのタンパク質生合成の触媒阻害物質（例えば、国際公開WO 93/24620を参照）、シュードモナス外毒素、大腸菌熱不安定性毒素、大腸菌熱安定性毒素、Eag EC安定性毒素-1（EAST）、細胞毒素の生物学的に活性の断片、ならびに、当業者には公知のその他の物質。大腸菌およびサルモネラの毒素については、例えば、Escherichia and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Neidhardtら（編）におけるO' BrianおよびHolmesによるProtein Toxins of Escherichia coli and Salmonella, pp. 2788-2802, ASM Press, ワシントンD. C. を参照されたい。

[0124]

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、バクテリオシンファミリーのメンバー（例えば、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144参照）であるが、ただし、該バクテリオシンファミリーのメンバーは、バクテリオシン放出タンパク質（BRP）ではない。バクテリオシンファミリーのメンバーの例として、限定するものではないが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1またはAP41、メガシンA-216、ミクロシンM15、およびビプリオシン（JayawardeneおよびFarkas-Himsley, 1970, J. Bacteriology vol. 102 pp 382-388）が挙げられる。最も好ましくは、一次エフェクター分子は、コリシンE3またはVであるが、コリシンA、E1、E2、1a、1b、K、L、およびM（Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144参照）も、一次エフェクター分子として適している。この実施形態の別の好ましい態様では、バクテリオシンは、クロアシンであり、最も好ましくは、クロアシンDF13である。

[0125]

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ColE1、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、またはColE9である。コリシンE3（ColE3）は、白血病細胞モデル系（Fiskaら、1978, Experientia 35:406-40）等の哺乳動物細胞（Smarkaら、1978, Folia Microbiol. 23:272-277）に深く細胞傷害性作用を及ぼすことがわかっている。ColE3の細胞毒性は、タンパク質合成を停止する機能であり、これは、80Sリボソームの阻害により媒介される（Turnowskyら、1973, Biochem. Biophys. Res. Comm. 52:327-334）。さらに具体的には、ColE3は、リボヌクレアーゼ活性（Saunders, 1978, Nature 274:113-114）を有する。その天然形態では、ColE3は、1:1の比で50kDaおよび10kDaタンパク質からなる60kDaタンパク質複合体であり、大きい方のサブユニットはヌクレアーゼ活性を有し、また、小さい方のサブユニットは50kDaサブユニットの阻害機能を有する。このように、50kDaタンパク質は、細胞傷害性タンパク質（または毒素）として作用し、10kDaタンパク質は、抗毒素として作用する。従って、一実施形態では、ColE3を二次エフ

(38)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エフェクター分子として用いる場合には、大きい方のColE3サブユニットもしくはその活性断片を単独で、または小さい方のサブユニットより高いレベルで発現させる。本発明の別の実施形態では、ColE3 50 kDa毒素および10 kDa抗毒素を、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌内の単一プラスミドにコードさせる。この実施形態では、毒素／抗毒素は、プラスミドを保有するサルモネラの選択系として作用することができ、これにより、該プラスミドを欠失したサルモネラは上記毒素により死滅する。別の実施形態では、10 kDa抗毒素は、プラスミド上のcolE3毒素から離れて染色体上にあり、他の細菌に対する透過障壁を形成している（以下の第5、6節を参照）。

[0126]

本発明の別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、クロアシンDF13である。クロアシンDF13は、ColE3と同様に機能する。タンパク質複合体は、67 kDa分子量である。個々の成分のサイズは、57 kDaおよび9 kDaである。リボヌクレアーゼ活性以外に、DF13は、細胞カリウムの漏出を引き起こすことができる。

[0127]

別の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、コリシンVである（Plasmids, a Practical Approach 1987, K. G. Hardy編におけるPugsley, A. P. およびOudega, B. による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"; Gilson, L. ら、EMBO J. 9:3875-3884）。

[0128]

別の実施形態では、一次エフェクター分子は、下記のものである：コリシンE2（構造は、ColE3に類似した二重サブユニットであるが、リボヌクレアーゼ活性ではなく、エンドヌクレアーゼ活性を有する）；イオン透過性チャンネルを形成し、細胞のプロトン駆動力を崩壊させ、細胞死に至らしめるコリシンA、E1、Ia、IbまたはK；タンパク質、DNAおよびRNA合成を阻害するコリシンL；細胞の浸透圧環境を改変することにより、細胞敗血症を引き起こすコリシンM；コリシンBと同様に機能するベスチシンA1122；細孔形成バクテリオシンであるスタフィコクシン1580；未知の標的を介して、RNA、DNAおよびタンパク質合成を間接的に阻害するブナリシン7423；ピオシンP1、すなわち、溶質輸送からの呼吸を脱共役することにより、細胞を死滅させるバクテリオファージテールタンパク質に似たタンパク質；コリシンE2様の作用を有するピオシンAP41；または細胞内物質の漏出を引き起こすホスホリパーゼであるメガシンA-216（バクテリオシンの概要については、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:125-144を参照）；コリシンA（Plasmids, a Practical Approach 1987, K. G. Hardy編におけるPugsley, A. P. およびOudega, B. による"Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"）。

[0129]

従って、一次エフェクター分子は、本明細書に記載した、または当業者には公知のあらゆるバクテリオシンを含んでよいが、ただし、該バクテリオシンは、バクテリオシン放出タンパク質ではない。

[0130]

別の具体的な実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍阻害酵素またはその機能性断片である。腫瘍阻害酵素の例として、限定するものではないが、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼが挙げられる。好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、メチオナーゼである。

[0131]

本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫等の固形腫瘍を治療または予防する上で有用である。

(39)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

【0132】

本発明は、一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明は、適したプロモーターに機能的に連結された本発明のエフェクター分子をコードする核酸を提供する。場合に応じて、エフェクター分子をコードする核酸は、転写、翻訳、局在化、安定性等に関与するその他のエレメントに機能的に連結することもできる。

【0133】

一次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6～約100,000塩基対である。好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約50,000塩基対である。さらに好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約10,000塩基対である。さらにまた好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対～約4,000塩基対である。

【0134】

5. 3. 一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子

本発明の特定の実施形態では、一次エフェクター分子（例えば、TNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドもしくはポリペプチド、抗血管新生因子、または腫瘍抑制酵素）は、場合に応じて、別の分子、すなわち、二次エフェクター分子と一緒に、細菌ベクター内で共発現させる。二次エフェクター分子は、付加的治療価値を提供し、かつ／または周囲の環境へ（少なくとも1種の一次エフェクター分子、および、場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現させる）修飾細菌ベクターの内容物の放出を促進する。本明細書で用いる用語「付加的治療価値」とは、一次エフェクター分子が提供するもの以外に、二次エフェクター分子が、腫瘍に対し、付加的もしくは相乗的、細胞分裂抑制性、または細胞傷害性作用をもたらすことを指す。従って、二次エフェクター分子は、付加的治療因子および／または放出因子として機能する。好ましくは、二次エフェクター分子は、付加的治療因子もしくは放出因子（または両方）のいずれであっても、所望の部位、すなわち、腫瘍の部位で、優先的または特異的に活性化もしくは発現させる。特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、2つの機能を果たす、すなわち、細菌細胞内容物の放出を促進する（例えば、細菌細胞溶解または準溶解を促進することにより）と同時に、治療価値を提供する（例えば、腫瘍細胞に対する細胞毒性により）ことができる。特定の非制限の実施形態では、二次エフェクター分子の細胞毒性は、患者の免疫系が介在しうる；従って、このような二次エフェクター分子は、免疫調節剤として機能することができる。

【0135】

本明細書の特定の実施形態では、本発明の弱毒性腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現させるように操作する。すなわち、二次エフェクター分子の発現により、腫瘍または腫瘍細胞の死滅または成長の障害が起こる。

【0136】

二次エフェクター分子は、タンパク質性または核酸分子である。核酸分子は、二本鎖もしくは一本鎖DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNA、ならびに、三重らせん核酸分子のいずれでもよい。核酸分子は、リボザイム、またはアンチセンス核酸等として機能することができる。

【0137】

アンチセンスヌクレオチドは、mRNAまたはDNA等の核酸に、配列特異的に結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合すると、アンチセンスは、mRNAの翻訳を阻止する（例えば、米国特許第5,168,053；5,190,931；5,135,917；および5,087,617号参照）。三重らせん分子とは、二重らせんDNAと結合して、共直線性三重らせん分子を形成し、これにより、転写を阻止する一本鎖DNAを意味する（例えば、米国特許第5,176,996号を参照）。

【0138】

(40)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

リボザイムは、mRNA等のRNA基質を特異的に切断することにより、細胞成長もしくは発現を阻害または干渉するRNA分子である。RNA鎖の切断および／または連結に関与するリボザイムとして、少なくとも5クラスのリボザイムが知られている。リボザイムは、任意のRNA転写産物を標的とすることができ、その転写産物を触媒的に切断することができる（例えば、米国特許第5,272,262号；米国特許第5,144,019号；および米国特許第5,168,053、5,180,818、5,116,742および5,093,246号を参照）。

【0139】

一次エフェクター分子についてすでに記載したように、二次エフェクター分子をコードまたは含有する核酸には、機能的連結で、選択したプロモーターを付与する、また、場合に
19
応じて、機能的連結で、転写、翻訳、局在化、安定性および／またはその他に参加する他のエレメントを付与する。さらに、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子および内部リボソーム結合部位と同じプロモーターを用いて、または、一次エフェクター分子とは異なるプロモーターを用いて、発現させることができる。

【0140】

二次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6塩基対から約100,000塩基対である。好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約50,000塩基対である。より好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約10,000塩基対である。さらに好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約4,000塩基対である。
20

【0141】

下記の二次エフェクター分子をコードするエフェクター分子のヌクレオチド配列は、よく知られている（GenBank参照）。二次エフェクター分子（この二次エフェクター分子は、細胞傷害性もしくは細胞分裂抑制因子、またはその生物学的に活性の断片、変異体もしくは誘導体である）をコードする核酸分子は、増幅（例えば、PCR）、ゲノムまたはcDNAライブラリーのプローブハイブリダイゼーション、発現ライブラリーの抗体スクリーニング等の標準的方法により単離してもよいし、化学的に合成しても、または市販の、もしくは他の供給源から得られたものでもよい。

【0142】

本明細書に記載した用途で使用する核酸分子およびオリゴヌクレオチドは、当業者には公
30
知である任意の方法により合成することができる（例えば、国際公開WO93/01286、米国特許第5,218,088；5,175,269；および5,109,124号参照）。アンチセンス試薬として使用するオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定は、当業者には公知の方法を含む。

【0143】

5.3.1. 付加的治療価値をもたらす因子

本発明の特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現する。すなわち、該二次エフェクター分子の発現により、腫瘍もしくは腫瘍細胞の死滅、またはそれらの成長の阻害、あ
40
るいは、腫瘍細胞の転移の阻害が起こり、これによって、一次エフェクター分子の細胞傷害性または細胞分裂抑制作用を増強する。一実施形態では、二次エフェクター分子の腫瘍への作用は、一次エフェクター分子の作用に付加的なものである。好ましい実施形態では、この作用は、超付加的または相乗的である、すなわち、一次および二次エフェクター分子を個別に投与した場合の作用を合わせたものより大きい。

【0144】

特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、タンパク質合成との干渉、または細胞周期の破壊により細胞成長を阻害することによって、細胞に対し、細胞傷害性または細胞分裂抑制性である。このような物質は、例えば、rRNAもしくはリボ核タンパク質を切断する、伸張因子を阻害する、mRNAを切断する、または、タンパク質合成を細胞が生存
50

(41)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

できないレベルまで低下させるその他の機構により、作用すると考えられる。このような二次エフェクター分子の例として、限定するものではないが、サボリン、リシン、アブリン、およびその他のタンパク質不活性化リボソーム (RIP) が挙げられる。

【0145】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、プロドラッグ変換酵素またはこれをコードする核酸、すなわち、薬物の化学的性質を調節して、細胞傷害性薬剤を生成する酵素である。プロドラッグ変換酵素の例は、Pawelekらにより国際公開WO96/40238の第33頁の表2に一覧が記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に組み入れる。国際公開WO96/40238はまた、このようなプロドラッグ変換酵素を含む分泌融合タンパク質の生成方法も教示している。本発明によれば、プロドラッグ変換酵素は、BRPのような放出因子と共発現させた場合、分泌タンパク質である必要はない（以下の第5.3.2節を参照）。具体的実施形態では、プロドラッグ変換酵素は、マイトマイシンCおよびボルフィロマイシン (Murrayら、1994, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 270:645-649) に作用するシトクロム p450 NADPHオキシドレダクターゼである。別の実施形態では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、補因子（例えば、NADH、NADPH、ATP等）の放出を起こすことにより、プロドラッグ変換酵素の活性を増強する。この実施形態の別の態様では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、活性化薬物（例えば、細菌細胞質または周辺細胞質内で活性化され、細菌ベクターから放出された薬物）を放出させる。

【0146】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、誘導性酸化窒素シンターゼ (NOS) または内皮性酸化窒素シンターゼの阻害剤である。酸化窒素 (NO) は、血管成長の調節および動脈硬化に関与すると考えられている。NOは、酸化窒素シンターゼ (NOS) によりL-アルギニンから形成され、免疫、炎症および心臓血管応答を調節する。

【0147】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、癌遺伝子もしくは増殖因子（例えば、bFGF、int-2、hst-1/K-FGF、FGF-5、hst-2/FGF-6、FGF-8）または細胞受容体もしくはリガンド等の細胞増殖に関与するタンパク質の生成または活性を阻害することによって、細胞に対し、毒性を有する、または細胞分裂を抑制する。阻害は、転写または翻訳（リボザイムまたは三重らせんDNAである二次エフェクター分子により媒介される）のレベルで、あるいは、タンパク質活性（ドミナントネガティブ突然変異体等の増殖因子経路の阻害剤である二次エフェクター分子により媒介される）のレベルで、行うことができる。

【0148】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、サイトカイン、ケモカイン、または免疫調節タンパク質もしくはこれをコードする核酸、例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)；内皮単球活性化タンパク質-2 (EMAP2)、GM-CSF、IFN- γ 、IFN- α 、MIP-3 α 、SLC、MIP-3 β 、またはHLA-B7のようなMHC遺伝子である。このような免疫調節エフェクター分子の送達は、免疫系を調節し、宿主の抗腫瘍免疫の能力を高めるであろう。あるいは、B7.1およびB7.2等の共刺激分子、CD28およびCTLA-4両方に対するリガンドをコードする核酸分子も送達することにより、T細胞性免疫を増強することもできる。さらに別の免疫調節剤は、 α -1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、これを腫瘍細胞に発現させると、補体性細胞死を可能とする。さらに、別の免疫調節剤は、腫瘍関連抗原、すなわち、対応する非癌性細胞には発現しないが、腫瘍細胞に特異的に発現する分子、または対応する非癌性細胞よりも高いレベルで、腫瘍細胞に発現する分子である。腫瘍関連抗原の例は、Kuby, Immunology, W. H.

(42)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Freeman and Company, ニューヨーク、NY, 第1版(1992)、pp. 515-520 (本明細書に参照により組み入れる)に記載されている。腫瘍関連抗原の他の例は、当業者には公知である。

【0149】

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、Flt-3リガンドまたはこれをコードする核酸である。別の実施形態では、二次エフェクター分子は、BRPである。

【0150】

具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子がTNFファミリーのメンバーのとき、TNFファミリーメンバーではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が抗血管新生因子のとき、抗血管新生因子ではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドのとき、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドではない。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が腫瘍抑制酵素のとき、腫瘍抑制酵素ではない。

【0151】

5. 3. 2. 腫瘍環境への抗腫瘍エフェクター分子の放出を促進する因子

本発明の他の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現するが、該二次エフェクター分子は、細菌細胞膜を透過可能にする、もしくは細胞外環境への細胞内成分の放出を増強する機能を果たし、これによって、一次および/または二次エフェクター分子の送達を増強する。このように、細菌細胞を透過可能にする、または放出を増強する二次エフェクター分子は、「放出因子」と呼ぶ。特定の実施形態では、放出因子は抗腫瘍活性も有するのが有利である。

【0152】

本発明の細菌ベクターにより発現させる放出因子は、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性のものでも、あるいは、外因性のもの(例えば、弱毒化腫瘍標的細菌にネイティブではない核酸によりコードされたもの)でもよい。放出因子は、プラスミドを含む核酸、または弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれた核酸により、コードすることができる。放出因子は、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。放出因子は、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、放出因子は、Omp様タンパク質と融合させた一次エフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、放出因子の共発現により、細胞周辺腔からの融合タンパク質の放出を増強することができる。

【0153】

好ましい実施形態では、このような因子は、バクテリオシン放出タンパク質、すなわち、BRP (本明細書では、一般にBRPと呼ぶ)の1つである。本発明で用いるBRPは、限定するものではないが、クロアシンDF13プラスミド、コリシンE1~E9プラスミドの1つ、もしくはコリシンA、NまたはDプラスミドを含む当業者には公知の任意の供給源に由来するものでよい。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13 (pC10DF13 BRP) から成る。

【0154】

一般に、BRPは、45~52アミノ酸ペプチドであり、これは、初め、シグナルエンドペプチダーゼによって切断されないシグナル配列を含む前駆体分子(PreBRP)として合成される。BRP活性は、少なくとも部分的に、デクージェント耐性外膜ホスホリパーゼA (PldA) により媒介されると考えられ、通常、外膜リン脂質の分解の増加に関連している(BRPの概要については、van der Walら、1995、FEMS Microbiology Review 17:381-399を参照されたい)。機構に関して制限するわけではないが、BRPは、周辺細胞質成分の優先的放出を促進するが

(43)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

、これより少ない程度での細胞質成分の放出も検出されている。適度に過剰発現させると、BRPは細菌膜を脆弱にし、細胞質成分の準溶解および高放出を誘導する。さらに、BRPは、超高レベルで発現させると、このタンパク質が細菌細胞溶解を引き起こし、溶菌放出により細胞内容物を送達することができると考えられる。この実施形態で、BRP発現は、BRP活性（例えば、細菌内容物の放出）と相関すると考えられる。例えば、超高BRP活性により、実質的にすべての細菌の細菌細胞溶解が起こる。従って、本明細書で用いる「超高発現」は、実質的に全細菌の細菌細胞溶解を引き起こすBRPの発現レベルとして定義される。BRPを発現しない対照細菌と比較して、適度のBRP活性は、細菌の溶解を必要とせず、細菌内容物の部分的または増強された放出を伴う。従って、この実施形態では、BRPの適度な過剰発現とは、実質的にすべての細菌の細菌溶解を伴わずに、細胞質成分の放出が増加される発現レベルを意味する。本明細書で用いる実質的にすべての細菌とは、細菌の60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは90~100%を意味する。

【0155】

本発明の具体的実施形態では、BRPタンパク質は、pC10DF13BRP突然変異体であり、その溶菌機能は、そのタンパク質放出機能とは分離されているため、細菌溶解なしに、タンパク質放出を増強する（van der Walら、1998, App. Env. Microbiol. 64:392-398）。この実施形態により、細菌ベクターからのタンパク質放出が長くなると共に、ベクターの頻繁な投与の必要性が減少する。別の具体的実施形態では、本発明のBRPは、C末端を短くしたpC10DF13BRPであり、これは、タンパク質放出に加えて、細胞溶解を引き起こす（Lairinkら、1989, J. Bacteriol. 171:2673-2679）。

【0156】

本発明の別の実施形態では、増強された放出系は、ボーリンタンパク質の過剰発現を含む：例えば、Sugawara, E. およびNikaido, H., 1992, J. Biol. Chem. 267:2507-11を参照のこと。

【0157】

特定の実施形態では、本発明の細菌ベクターによりBRPを発現させる場合、BRPは、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性でも、あるいは、外因性のもの（例えば、弱毒化腫瘍標的細胞にネイティブではない核酸によりコードされたもの）でもよい。BRPは、プラスミドを含む核酸により、または弱毒化腫瘍標的細胞のゲノムに組み込まれたタンパク質核酸によりコードすることができる。また、BRPは、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。さらに、BRPは、二次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、BRP様タンパク質は、Omp様タンパク質と融合させたエフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内で発現させる。この実施形態では、BRPの共発現により、融合タンパク質の放出を増強することができる。

【0158】

本発明の好ましい具体的実施形態では、BRPをコードする核酸は、コリシンプラスミドによりコードされる。本発明の別の具体的実施形態では、BRPコード核酸は、ネイティブのBRPプロモーターの制御下で発現させるが、その際のプロモーターは、その正常な宿主（BRPの場合、Enterococcus cloacae）においてストレス（例えば、紫外線等のDNA損傷を起こす条件）に応答するSOSプロモーターであり、しかも、サルモネラにおいて部分的に構成的である。好ましい実施形態では、BRPコード核酸は、pepTプロモーターの制御下で発現させるが、その際、該プロモーターは、腫瘍環境の嫌気性性質に応答して活性化する（例えば、Lombardoら、1977, J. Bacteriol. 179:1909-17）。

【0159】

あるいは、プロモーターは、Tn10トランスポゾンのtetプロモーター等の抗生物質

(44)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

誘導プロモーターであることができる。好ましい実施形態では、tetプロモーターは、単量体 (singlemer) であり、該単量体は、ドキシサイクリンおよびアンヒドロテトラサイクリン等のテトラサイクリンまたはその類似体の存在に、悉無律的に応答し、遺伝学的に安定したオン・オフスイッチを提供する。別の実施形態では、tetプロモーターは、多量体化 (例えば、3倍) する。このような多量体は、テトラサイクリンの存在に段階的に応答し、エフェクター分子レベルの制御をより操作しうる系を提供する。次に、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌で治療している被験者に、適した用量のテトラサイクリンを投与することにより、プロモーター活性を誘導する。tet誘導性発現系は、当初、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (FaryarおよびGatz, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) および哺乳動物細胞 (LangおよびFeingold, 1996, *Gene* 168:169-171) 等の真核細胞系について記載されていたが、近年の研究で、細菌細胞までその適用性が広がっている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226:243-252) は、tetプロモーターに機能的に連結させたtet誘導における、ホタル (firefly) ルシフェラーゼ遺伝子の80倍誘導を明らかにした。このプロモーターの利点は、非常に低レベルのテトラサイクリン、すなわち、抗生物質活性に必要な用量の約1/10で、誘導される点である。

【0160】

5.4. 誘導体と類似体

本発明は、さらに、誘導体をコードまたは送達するように修飾された細菌ベクターを包含する。この誘導体として、限定するものではないが、一次および/または二次エフェクター分子、もしくはこれをコードする核酸の断片、類似体、あるいは変異型が挙げられる。誘導体、類似体または変異型は、機能的に活性であり、例えば、全長の、野生型エフェクター分子に関連する1以上の機能活性を示すことができる。一例として、所望の治療特性を有するこのような誘導体、類似体または変異型を用いて、腫瘍成長または腫瘍細胞の分散 (転移) を阻害することができる。エフェクター分子の誘導体または類似体は、本明細書に記載したもの等、当業者には公知の方法により、所望の活性について試験することができる。

【0161】

特に、野生型エフェクター分子と同じ、もしくはこれより高い抗腫瘍機能を有する分子を提供する置換、付加 (例えば、挿入) または欠失により、エフェクター分子コード配列を改変することにより、変異型を作製することができる。例えば、本発明の変異型としては、限定するものではないが、一次アミノ酸配列として、エフェクター分子のアミノ酸配列の全部または一部を含むものが挙げられ、これには、機能的に同等のアミノ酸残基を配列内で、サイレント変化を起こす残基で置換した、改変された配列がある。すなわち、改変された配列は、少なくとも1の保存的置換を有する。

【0162】

哺乳動物に由来する一次または二次エフェクターコード核酸のいずれかを改変して、当業者には公知の方法により、細菌コドン使用頻度を用いることができる。好ましいコドン使用頻度は、下記に例示されている: *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, および Zhangら, 1991, *Gene* 105:61-72。

【0163】

具体的実施形態では、一次または二次エフェクター分子の誘導体、類似体または変異型は、一次または二次エフェクター分子、またはその断片をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。ここで、ハイブリダイゼーションは、ストリントな条件下で、例えば、約45℃で6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) 中でフィルターに結合させたDNAとハイブリダイズさせた後、約50~65℃で0.2xSSC/0.1%SDS中で1回以上洗浄することにより行う。または、

(45)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

高度にストリンジェントな条件下で、例えば、約45℃で6 x SSC中でフィルターに結合させた核酸とハイブリダイズさせた後、約68℃で0.1 x SSC/0.2% SDS中で1回以上洗浄することにより実施する。あるいは、当業者には公知の他のストリンジェントな条件下で実施することができる（例えば、Ausubel, F. M. ら、編、1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, pages 6.3.1~6.3.6 および 2.10.3）。

【0164】

一次もしくは二次エフェクター分子の誘導体または類似体としては、限定するものではないが、一次もしくは二次エフェクター分子またはその断片に実質的に相対的な領域を含む分子（例えば、様々な実施形態における、挿入または欠失を一切含まない同じサイズのアミノ酸配列に対して、あるいは、アラインメントが当業者には公知のコンピュータ相対性プログラムにより実施されたアラインメント済配列と比較して、少なくとも60%または70%または80%または90%または95%同一性）、あるいは、そのコード核酸が、高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーまたは低ストリンジェンシー条件下で、エフェクター分子タンパク質エフェクター分子コード配列にハイブリダイズすることができる分子が挙げられる。

【0165】

例えば、一次エフェクター分子の配列と他の既知配列間の、2つのアミノ酸配列または2つの核酸の同一性百分率を決定するために、最適な比較目的に合わせて配列をアラインメントする（例えば、第1アミノ酸または核酸配列の配列にギャップを導入して、第2アミノ酸または核酸配列との最適アラインメントを達成することができる）。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1配列における位置が、第2配列における対応位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合には、分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一性百分率は、配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、%同一性=同一位置の数# / 位置の総数#（例えば、重複位置）×100）。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

【0166】

2つの配列間の同一性百分率は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。2つの配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの好ましい非制限的例は、KarlinおよびAltschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268のアルゴリズム（KarlinおよびAltschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877に記載されているように修正された）である。このようなアルゴリズムは、Altschulら、1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、語長=12を用いて実施することにより、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3を用いて実施することにより、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップアラインメントを得るためには、Altschulら、1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載されているように、ギャップBLASTを用いることができる。あるいは、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施してもよい（同上）。BLAST、ギャップBLAST、およびPSI-Blastプログラムを用いる場合には、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov. を参照のこと。配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの別の好ましい非制限的例は、MyersおよびMili

(46)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ierのアルゴリズム、CABIOS (1989)である。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である、ALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込まれている。ALIGNプログラムを使用してアミノ酸配列を比較する場合には、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティー、および、4のギャップペナルティーを用いることができる。配列分析のためのさらなるアルゴリズムは、当業者には公知であり、次のものが挙げられる：TorrellisおよびRobotti, 1994, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5に記載されたADVANCEおよびADAM; PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:2444-8に記載されたFASTA。FASTAでは、ktupが、検索の鋭敏性および速度を設定する制御オプションである。ktup=2であれば、比較している2つの配列における類似領域は、アラインメント済残基対を調べることによりみつげられる。また、ktup=1であれば、単一のアラインメント済アミノ酸を調べる。ktupは、タンパク質配列の場合は、2または1に、DNA配列の場合は、1~6に設定することができる。ktupが指定されていない場合には、デフォルトは、タンパク質については2、DNAについては6である。FASTAパラメーターのさらに詳細な説明については、<http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/fastal.html#sect2>を参照されたい。尚、この内容は、本明細書に参照により組み入れる。

【0167】

あるいは、タンパク質配列アラインメントは、Higginsら、1996, Methods Enzymol., 266:383-402に記載されているCLUSTAL Wアルゴリズムを用いて実施することができる。

【0168】

2つの配列間の同一性百分率は、ギャップのあるなしに拘わらず、前述したものと同様の技法を用いて決定することができる。同一性百分率を計算する際には、正確に同じものだけを計数する。

【0169】

一次エフェクター分子もしくは二次エフェクター分子、またはその誘導体または類似体は、当業者には公知の様々な方法により生成することができる。これらを生成するための操作は、核酸またはタンパク質レベルで行うことができる。例えば、エフェクター分子をコードする、クローン化されたエフェクター分子コード配列は、当業者には公知の多数の戦略のいずれかによって修飾することが可能である (Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク)。該配列は、制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な部位で切断し、次いで、所望であれば、さらに酵素による修飾を施し、単離した後、*in vitro*で連結することができる。一次または二次エフェクター分子の誘導体または類似体をコードする修飾エフェクター分子の生成の際、所望の一次または二次エフェクター分子活性がコードされるエフェクター分子コード配列領域において、修飾エフェクター分子コード配列が、翻訳停止シグナルにより中断されない状態で、ネイティブタンパク質と同じ翻訳リーディングフレーム内に残ることを確実にするよう注意しなければならない。

【0170】

さらに、エフェクター分子をコードする核酸を*in vitro*または*in vivo*で突然変異させることにより、翻訳、開始、および/または終結配列を形成および/または破壊する、あるいは、コード領域に変異を発生させる、および/または新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成する、もしくは既存のものを破壊することにより、*in vitro*修飾をさらに促進することができる。好ましい具体的実施形態では、エフェクター分子コード核酸を突然変異させることにより、例えば、さらに強力な変異型を生成する。当業

(47)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

者には公知の任意の突然変異誘発技法を用いることができ、この技法には、限定するものではないが、下記のものが挙げられる：化学的突然変異誘発、*in vitro* 部位指定突然変異誘発（Hutchinsonら、1978、J. Biol. Chem. 253:6551）、TAB（登録商標）リンカー（Pharmacia）の使用、突然変異を含むプライマーを用いるPCR等。好ましい実施形態では、エフェクター分子の1以上の推定非必須アミノ酸残基の位置において、保存的アミノ酸置換物を作製する。「保存的アミノ酸置換物」とは、アミノ酸残基を、類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基で置換したものを意味する。類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界で定義されている。これらのファミリーとしては、下記のものが挙げられる：塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 枝分かれ側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）をそれぞれ有するアミノ酸。あるいは、突然変異は、例えば、飽和突然変異誘発により、コード配列の全部または部分に沿って、ランダムに導入することができ、こうして得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることにより、活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発の後、コードタンパク質を発現させ、該タンパク質の活性を決定することができる。

【0171】

別の実施形態では、プロテアーゼ切断部位を含むように、本発明のエフェクター分子または融合タンパク質を構築する。

【0172】

5. 5. 融合タンパク質

特定の実施形態では、本発明は、融合タンパク質（例えば、別のタンパク質と共有結合している）として構築される一次または二次エフェクター分子を提供する。本発明は、このような融合タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明の特定の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸を、適したプロモーターに機能的に連結する。

【0173】

特定の実施形態では、エフェクター分子は、別のタンパク質のアミノ酸配列とのペプチド結合を介して、そのアミノ-またはカルボキシー末端に結合したエフェクター分子もしくはその断片（好ましくは、該エフェクター分子の少なくともドメインもしくはモチーフ、または、該エフェクター分子の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる）を含むキメラタンパク質または融合タンパク質として構築される。特定の実施形態では、融合物は、機能的に活性である異種ポリペプチドまたはその断片の少なくとも2、少なくとも6、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100の連続したアミノ酸を含む。一実施形態では、このようなキメラタンパク質または融合タンパク質は、別のタンパク質のコード配列にフレーム内結合した一次エフェクター分子をコードする核酸（例えば、TNFコード配列、抗血管新生因子コード配列、腫瘍抑制酵素コード配列、もしくは細胞傷害性ポリペプチドコード配列）の組換え発現により生成する。このようなキメラタンパク質は、当業者には公知の方法により、適正なコードフレーム内で、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を互いに連結した後、当業者には公知の方法で最適の発現運搬体にキメラ産物を発現することにより、作製することができる。任意の異種ポリペプチドコード配列と融合させたエフェクター分子をコードする核酸部分を含むキメラ核酸を構築してもよい。具体的実施形態は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、もしくは少なくとも100のアミノ酸からなる一次または二次エフェクター分子の断片、あるいは、全長一次または二次エフェクター分子の1以上の機能活性を示す断片を含むキメラタンパク質に関す

(48)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

る。

【0174】

具体的実施形態では、融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグ等のアフィニティータグ、または精製、単離、同定もしくは発現アッセイで用いることができるその他のアフィニティータグを含む。別の具体的実施形態では、融合タンパク質は、メタルプロテアーゼまたはセリン切断部位等のプロテアーゼ部位を含む。この実施形態では、腫瘍部位で活性であるプロテアーゼに対応するプロテアーゼ部位を本発明の融合タンパク質中に構築するのが好ましい場合もある。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質、もしくはその断片（例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、多重膜貫通ドメイン、あるいは、これらの組合せ：以下の第3、1節、Omp様タンパク質の定義を参照）との融合タンパク質として構築する。

【0175】

好ましい実施形態では、本発明のエフェクター分子（一次または二次）は、外膜タンパク質（Omp様タンパク質）を含む融合タンパク質として発現させる。細菌外膜タンパク質は、細菌外膜の膜内在性タンパク質であり、多重膜貫通（multiple membrane-spanning）ドメインを有し、多くの場合、1以上の脂質成分に結合している。外膜タンパク質は、初め、タンパク質を膜に向かわせるアミノ末端シグナルペプチドを有する前駆体の形態で発現し、その際に、シグナルペプチドをシグナルペプチダーゼにより切断して、成熟タンパク質を生成する。一実施形態では、エフェクター分子は、Omp様タンパク質との融合タンパク質として発現させる。この実施形態では、一次エフェクター分子は、細菌の外膜への送達が増強されている。機構に関して制限するわけではないが、本発明者は、Omp様タンパク質が、外膜に対するエフェクター分子のアンカーまたは連結鎖（tether）として働く、あるいは、細菌外膜にタンパク質を局在化させる役割を果たすと考える。一実施形態では、Omp様タンパク質とのエフェクター分子との融合を用いて、周辺細胞質へのエフェクター分子の局在化を増強する。別の実施形態では、Omp様タンパク質とエフェクター分子の融合を用いて、エフェクター分子の放出を増強する。具体的実施形態では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、 β ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグリカン関連リポタンパク質（PAL）、FepA、FhaA、NmpA、NmpB、NmpC、もしくは主要な外膜リポタンパク質（LPP等）の少なくとも一部である。本発明の特定の実施形態では、シグナル配列は、疎水性を高めて構築する（例えば、疎水性アミノ酸（例えば、ロイシン）への、シグナル配列内のアミノ酸の挿入または置換による）。実施例については、以下の第7、1～7、4節を参照のこと。

【0176】

本発明の別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、タンパク質分解切断部位を含む。タンパク質分解切断部位は、エフェクター分子に内在的またはOmp様タンパク質に内在的である、あるいは、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。特定の具体的実施形態では、本発明のOmp様タンパク質は、別々のタンパク質に由来する構造エレメントを含むハイブリッドOmpである。

【0177】

上記実施形態の態様例では、Omp様タンパク質はOmpAである。具体的Omp様タンパク質の構造的立体配置に留意しながら、OmpA様融合タンパク質の構築に用いた同じ原理を他のOmp様タンパク質に適用することができる。

【0178】

例えば、ネイティブOmpAタンパク質は、該タンパク質の170アミノ酸N末端ドメイン内に8つのアンチパラレル膜貫通 β 鎖を含む。膜貫通ドメインの各対の間には、膜貫通ドメインの挿入方向に応じて、細胞外または細胞内ループがある。C末端ドメインは、155アミノ酸からなり、これらは、細胞内に位置し、恐らく、細胞周辺腔を占めるペプチドグリカンと接触していると思われる。OmpA融合タンパク質の生成を促進する発現ベ

(49)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

クターが作製されている。例えば、Hobomら(1995, Dev. Biol. S
trand, 84:255-262)は、OmpAオープンリーディングフレームを含
むベクターを開発しており、これは、第3または第4細胞外ループをコードする配列内に
リンカーが挿入されている。該ループにより、選択した異種タンパク質のフレーム内挿入
が可能になる。

【0179】

本発明の一実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は、
周辺細胞質において発現を増強させた。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、成
熟前に、シグナル配列、または、一次エフェクター分子もN末端に位置するOmpAの少
なくとも1の膜貫通ドメインが続くシグナル配列を含む。シグナル配列は切断され、成熟
タンパク質から欠失している。上記実施形態の別の態様では、一次エフェクター分子は、
OmpA融合タンパク質のN末端にあるため、融合タンパク質が安定している限り、使用
したOmpAの膜貫通ドメインの数は、一次エフェクター分子の位置決定にとって重要で
はなくなる。上記実施形態のさらに別の態様では、一次エフェクター分子は、OmpAの
NおよびC末端ドメインの間に配置し、これによって、可溶性周辺細胞質タンパク質は、
周辺細胞質内の周辺細胞質プロテアーゼによる切断の際に、一次エフェクター分子を含有
する。この実施形態の特定の態様では、周辺細胞質一次エフェクター分子を発現する細菌
ベクターは、BPRも共発現することにより、細菌細胞からのエフェクター分子の放出を
増強する。

【0180】

本発明の別の実施形態では、一次エフェクター分子を含むOmpA融合タンパク質部分は
、細胞外細菌表面にある。該実施形態の一態様では、融合タンパク質は、一次エフェク
ター分子のN末端に位置するOmpAの偶数または奇数の膜貫通ドメインを含む。上記実施
形態の別の態様では、一次エフェクター分子をOmpAの2つの細胞外ループ間に配置し
て、細菌細胞による腫瘍細胞への表示を達成する。具体的実施形態では、本発明は、細菌
細胞外表面に位置するエフェクター分子融合タンパク質の発現プラスミドを提供する。例
えば、Trec(1pp)ompAと称されるプラスミドは、切断型ompA膜貫通配列に
融合したtrecプロモーター駆動リポポリタンパク質(1pp)アンカー配列を含む。別
の例として、上記プラスミドは、TrecompAと称し、trecプロモーター駆動omp
Aコードシグナル配列を含む。このようなプラスミドは、本発明の1以上のエフェクター
分子をコードする核酸を含むように構築することができる。

【0181】

場合に応じて、エフェクター分子は、腫瘍に豊富に存在するメタロプロテアーゼまたはセ
リンプロテアーゼの共通切断部位に先行されるか、もしくは該部位と隣接させることによ
り、腫瘍環境にエフェクター分子の放出を起こす。一次エフェクター分子が、プロテアー
ゼ切断部位に先行されるか、隣接させるかは、それぞれ、融合タンパク質内の末端に位置
するか、内部に位置するかによる。

【0182】

同様の融合タンパク質は、OmpAに関して前述した戦略を使用し、任意のOmp様タン
パク質と構築することができる。このような融合タンパク質の構築に際して、当業者には
明らかなように、エフェクター分子に融合させるOmp様タンパク質部分の選択は、エフ
ェクター分子の発現のために望ましい位置(例えば、周辺細胞質に、細胞外に、膜に結合
して等)に応じて異なる。一次エフェクター分子に関して、本明細書に記載したこのよ
うなタンパク質構築は、二次エフェクター分子に対しても適切である。

【0183】

好ましい実施形態では、エフェクター分子はフェリーペプチドに融合させる。融合タン
パク質に用いられるフェリーペプチドは、その生成または導入の拡散範囲(diffusi
on limits)内で、実質的にあらゆる細胞へ、目的とするポリペプチドまたはペ
プチドの送達を促進することが明らかにされている(例えば、Bayley, 1999
、Nature Biotechnology 17:1066-1067; Ferna 50

(50)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

andezら、1998, *Nature Biotechnology* 16:418-420;およびDerossiら、1998, *Trends Cell Biol.* 8:84-87)。従って、弱毒化腫瘍標的細菌が、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質を発現するように、該細菌を操作することにより、エフェクター分子が腫瘍細胞によって取り込まれる能力を増強する。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質をコードする核酸を発現するように操作する。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。これらの実施形態によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。フェリーペプチドの例として、限定するものではないが、HIV TATタンパク質に由来するペプチド、アンテナペディアルホメオドメイン (ペネトラキシン)、カポジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウイルスVP22、ポリヒスタジン (例えば、ヘキサヒスタジン; 6H)、ポリリシン (例えば、ヘキサリシン; 6K) およびポリアルギニン (例えば、ヘキサアルギニン; 6R) (例えば、Blankeら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8437-8442) が挙げられる。

【0184】

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、シグナルペプチド、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。この実施形態の具体的態様では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

【0185】

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍癌に送達するための、シグナルペプチド、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この態様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。

【0186】

非制限的例として、コリシン活性は、HIV TAT、単純ヘルペスウイルスVP22、アンテナペディアル、6H、6Kおよび6Rに由来する取り込み用ペプチドを添加することにより増強することができる。融合は、C末端、N末端または内部のいずれにおいても可能である。内部での融合は、N末端シグナル配列切断ペプチドの後に融合が続く場合、特に好ましい。融合タンパク質は、さらに、OmpA等のN末端シグナル配列、またはhlyA等のC末端シグナル配列を含む。

【0187】

好ましい実施形態では、エフェクター分子を毒素の送達部分に融合させる。様々な毒素が、自己送達能力を有することで知られており、その際、毒素の一部が、毒素の第2部分の送達因子として働く。例えば、Ballardら (1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12531-12534) は、哺乳動物細胞の細胞質ゾルコンパートメントへの致死因子 (LF) および浮腫因子のエントリーを媒介する炭疽 (anthrax) 保護剤 (PA) が、LFの切断型 (LF_n; 255アミノ酸残基) へのタンパク質融合物のエントリーも媒介できることを明らかにした。従って、本発明のエフェクター分子は、細胞の外部で機能するものを除き、LF_n、またはその他の毒素系 (限定するものではないが、ジフテリア毒素A鎖残基1-193等) (Blankeら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8437-8442)、コレラ毒素、ペロ毒素、大腸菌熱不安定性毒素 (LT)、大腸菌熱安定性毒素 (ST)、腸溶毒素、エンテロトキシン、細胞毒素、EaggEC安定性毒素1 (EAST)、CNF、細胞致死性膨張毒素、α溶毒素、β溶毒素、およびSheA溶毒素に融合

(51)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

することができる（詳しくは、例えば、O' BrienおよびHolmes, 1996, Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardtら（編）, ASM Press, ワシントンD. C., pp2788-2802参照）。具体的実施形態では、一次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。

【0188】

細菌内で発現させるための融合タンパク質の構築は、当業者には公知であり、このような方法は、本発明の範囲に含まれる（例えば、Makrides, S., 1996, Microbiol. Revs 60:512-538を参照。尚、この文献は、参照により本明細書にその全文を組み入れる）。

【0189】

5. 6 発現運搬体

本発明は1以上の一次エフェクター分子および1以上の任意の二次エフェクター分子をコードするよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフェクト可能な核酸にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上のエフェクター分子（例えば、一次または二次）が発現される場合には、エフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸分子にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸分子にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。組み込まれるエフェクター分子はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌の内生のものであってもよいし、またはエフェクター分子をコードする核酸分子が弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれるように、弱毒化腫瘍標的細菌に導入してもよい（例えば、プラスミド、トランスフェクト可能な核酸、トランスポゾンなどのようなエフェクター分子をコードする核酸の導入による）。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードする核酸分子に機能的に連結されているプロモーターは同種（すなわち、天然のもの）または異種（すなわち、エフェクター分子をコードする核酸分子に対して天然のものでない）であってもよい。

【0190】

本発明のエフェクター分子をコードするヌクレオチド配列またはその機能的に活性な類似体もしくは断片もしくはその他の誘導体は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。必須転写および翻訳シグナルはエフェクター分子および/またはそのランキン領域によって供給されてもよい。あるいは、発現運搬体は、DNA操作の分野で公知の種々の方法の1つを用いて、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、好適な翻訳開始および終結シグナルとともに、機能性プロモーターと機能可能な読み取り相で挿入することによって構築する。概論として、Sambrookら, 1989, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, New York, NYを参照。これらの方法はin vitro組換えDNAおよび合成技術およびin vivo組換え（遺伝子組換え）を含み得る。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。

【0191】

本発明はまた1以上の融合タンパク質および1以上の任意のエフェクター分子をコードするよう改変された弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフ

(52)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エクト可能な核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上の融合タンパク質および/またはエフェクター分子（例えば、一次または二次）が発現される場合には、融合タンパク質および/もしくはエフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸にコードされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。本発明はまた適当なプロモーターに機能的に連結されている融合タンパク質をコードする核酸分子も提供する。本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。

10

[0192]

本発明のある特定の実施形態では、本発明の発現運搬体はプラスミドである。当業者には多数の好適なプラスミドが知られており、また市販のものを入手して本発明の組換え構築物を作製することもできる。

[0193]

かかる市販のプラスミドとしては、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) およびGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) が挙げられる。これらのpBR322「基幹」部分を適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pBR322は低コピー数プラスミドであると考えられている。高レベルの発現を望む場合には、プラスミドは高コピー数プラスミド、例えば、pUC基幹を含むプラスミドであってもよい。pUCプラスミドとしては、限定されるものではないが、pUC19 (例えば、Yanisch-Perronら, 1985, Gene 33:103-119参照) およびpBluescript (Stratagene) が挙げられる。

20

[0194]

以下のプラスミドが例として挙げられ、本発明の方法とともに使用できる。細菌性：pBs, phagescript, phiX174, pbluescriptSK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrec99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia)。pBR322「基幹」を含む市販のプラスミド、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) およびGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) も使用できる。これらを適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わせる。pCET, pTS (本明細書の第6節に記載されるような)。

30

[0195]

本発明の特定の実施形態では、エフェクター分子をコードするプラスミドは本明細書の第6節に記載されるpTS-TNF- α プラスミド、pTS-BRPプラスミド、またはpTS-BRPTNF- α プラスミドである。

[0196]

本発明の特定の実施形態では、OmpAシグナル配列および一次エフェクタータンパク質を含んでなる、細胞膜周辺腔への分泌のための本発明の融合タンパク質はプラスミドpIN-III-ompA-Hindにコードされており、これは一次エフェクター分子のコード配列がクローニングされ得るリンカー配列の上流にompAシグナル配列をコードするDNA配列を含む。好ましい特定の実施形態では、pIN-III-ompA-Hindベクターのlac誘導性プロモーターをpepTまたはtetプロモーターで置換する (Rentier-Delrueら (1988), Nuc. Acids Res. 16:8726参照)。

40

[0197]

本発明はまたエフェクター分子のトランスポゾン媒介性染色体組込みを提供する。本発明の方法には、エフェクター分子をコードする核酸がトランスポゾンカセット中に構築され

50

(53)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

得る限り、当技術分野で公知のいずれのトランスポゾンプラスミドを用いてもよい。例えば、本発明はトランスポゾンまたはミニトランスポゾンおよびMCSを含んでなるトランスポゾンプラスミドを提供する。

【0198】

本発明のある実施形態では、本発明のプラスミドはトランスポゾンプラスミドである、すなわち、注目されるエフェクター分子をコードする配列が挿入されたトランスポゾンを含んでなる。トランスポゾンプラスミドはトランスポゾンカセットを含み、このカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。従って、エフェクター分子またはその融合タンパク質をコードする核酸をトランスポゾンカセットに挿入する。このようにして、トランスポゾン挿入によりそのカセットが細菌ゲノムに組み込まれる。エフェクター分子のコード配列はプロモーターに機能的に連結していてもよいし、またはプロモーターなしでもよい。後者の場合には、選択マーカーの発現は細菌ゲノムへのトランスポゾン挿入部位にあるプロモーターによってなされる。トランスポゾンが挿入された細菌のコロニーを本発明の要件に一致する発現レベルについて、例えば、腫瘍の細胞傷害性、静止、退縮を増強するのに十分なレベルのサイトカインを発現するものをスクリーニングする。

【0199】

ある実施形態では、トランスポゾンプラスミドがトランスポゾンの他に、トランスポゾンの逆位反復配列の外側に、トランスポゾンとともに運ばれることなく、トランスポゾンの細菌ゲノムへの挿入を触媒するトランスポザゼ遺伝子を含んでなり、そのようにして安定なトランスポゾン挿入を有する細菌菌株を作製する。

【0200】

本発明に利用されるトランスポゾンとしては、限定されるものではないが、Tn7、Tn9、Tn10およびTn5が挙げられる。好ましい実施形態では、トランスポゾンプラスミドはTn10挿入エレメントの外側に位置するアンピシリン耐性遺伝子を有するpNK2883(ATCC)であり、1以上のエフェクター分子をコードする核酸が2個のTn10挿入エレメントの間(例えば、トランスポゾンカセット内)に挿入されている。好ましくは、構築物はその他のエレメントをコードするさらなる配列が2個のTn10挿入エレメントの間に挿入されるように作製する。特定の実施形態では、かかるエレメントは所望により(1)プラスミドを含む細菌の陽性選択のための選択マーカー(例えば、SerC、AroAなど)のプロモーターのないコピー；(2)BRP遺伝子、(3)1以上の一次エフェクター分子(TNF- α 、またはその融合タンパク質、例えば、Omp-A-TNF- α 融合物など)をコードする核酸に機能的に連結されたエフェクター分子(trcなど)のプロモーター、(4)1以上のエフェクター分子をコードする核酸のターミネーターを含んでもよい。

【0201】

ある実施形態では、必要に応じてプラスミドを操作し、プラスミドにコードされるアンピシリン耐性特性を用いて所望の構築物を有するクローンを選抜した後、プラスミドの喪失によって抗生物質選抜が除去され、ヒト患者への投与のための染色体トランスポゾン挿入部分を有する菌株を選択する(例えば、選択培地にプレーティングすることによる)。

【0202】

もう1つの特定の実施形態では、標的的特異性が変化したトランスポザゼ遺伝子およびプロモーターのないserC遺伝子のコード配列およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTSを用いる。もう1つの特定の実施形態では、標的的特異性が変化したトランスポザゼ遺伝子およびプロモーターのないserC遺伝子のコード配列、およびアルキル化剤誘導性バクテリオシン放出因子およびMCSを含むミニトランスポゾンを含んでなるプラスミドpTS-BRPを用いる。

【0203】

好ましい実施形態では、トランスポゾン媒介性染色体組込み体の選抜のためのトランスポゾンプラスミドは以下を含んでなる：

a) トランスポゾン挿入配列の外側に(例えば、トランスポゾンカセットの外側に)位置

(54)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

するトランスポゾン切り出しおよび組込みのためのトランスポザーゼ遺伝子；

b) 細菌菌株において欠失した選択遺伝子（例えば、*serC*）に相当する野生型コード配列ならびにリボソーム結合部位および野生型遺伝子のターミネーター（ただし、プロモーターは欠く）。この配列は好ましくは左側のTN10トランスポゾン挿入配列の直後に位置する；

c) 所望により、右側および左側の挿入配列の間が放出増強核酸（例えば、BRP）をコードする核酸配列である；ならびに

d) 右側および左側の挿入配列の間に位置し、プラスミド内に唯一の制限部位を複数含む、エフェクター分子の組込みのためのマルチブルクローニング部位（MCS）。MCSは好ましくは放出増強核酸の直後（使用する場合には）、かつ、右側のTN10挿入配列の直前に位置する。 10

【0204】

もう1つの実施形態では、宿主染色体へのエフェクター分子のランダムな組込みに起因する遺伝子破壊により、エフェクター挿入の遺伝子位置の適性を確認する。

【0205】

さらにもう1つの実施形態では、発現運搬体は抗生物質選抜を必要としない安定な、すなわち、自己維持される染色体外プラスミドである。限定するものではないひとつの実施例では、自己維持型発現運搬体はサルモネラ病原性プラスミドである。

【0206】

例えば、本発明のある実施形態では、プラスミド選抜系をサルモネラ菌などの細菌が失っている機能を提供することで維持し、それに基づいて機能を有するサルモネラ菌をそうでないものから選抜することができる。ある実施形態では、本発明のサルモネラ菌は栄養要求性変異菌株であり、発現プラスミドは変異株すなわち生合成酵素機能が欠けたものを提供する。発現プラスミドを含むサルモネラ菌は細胞を所望の細胞、すなわち、発現プラスミドを含むもののみが代謝できる栄養素を欠く増殖培地で増殖させることで選抜できる。この実施形態の非常に好ましい態様では、最も好ましくは*asd*遺伝子の欠失によって、本発明のサルモネラ菌はDAP（メソジアミノピメリン酸）を不可避に要求する。DAPはグラム陰性菌の周辺細胞質に存在するペプチドグリカンの構成要素であり、完全な細菌外膜に必要である。DAPがないと細菌細胞は外膜が完全でないために溶解してしまう。 20
 β -アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）遺伝子はDAP生合成経路中の酵素をコードしている。*asd*機能を欠くグラム陰性菌は培養培地にDAPを供給することで増殖させられる。同種または異種プロモーターに機能しうる形で連結した β -アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）遺伝子配列を保持するプラスミド、例えば、本発明の発現プラスミドはDAPの不在下で β -アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）活性を欠くグラム陰性菌を増殖させることで選抜できる（例えば、Curtiss, IIIの米国特許第5,840,483号参照）。 30

【0207】

その他の非抗生物質選抜系が当技術分野で知られており、かつ、本発明の範囲内にある。例えば、安定な毒素とあまり安定でない抗毒素を含んでなるプラスミドを利用する選抜系を使用してかかるプラスミドを維持する細菌を選抜してもよい。

【0208】

もう1つの実施形態では、発現運搬体は非抗生物質的方法で選抜できる染色体外プラスミド、例えば、コリシンプラスミドである。本明細書において、コリシンプラスミドは最低限コリシン毒素および抗コリシンをコードし（コリシン毒素は抗コリシンよりもより安定である）、その結果、コリシンプラスミドを欠く細菌はいずれもコリシン毒素が継続する結果として死滅する。好ましい実施形態では、コリシン毒素はCoIE3の大サブユニットであり、抗コリシンはCoIE3の小サブユニットである。 40

【0209】

本発明のその他の実施形態では、発現運搬体は λ ベクター、より詳しくは溶原性 λ ベクターである。好ましい実施形態では、 λ ベクターを含んでなる細菌宿主は30℃では機能的であるが37℃ではそうでない温度感受性 λ リプレッサーをさらに含んでなる。従って、 50

(55)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

細菌宿主は30℃で細菌細胞にとって毒性であり得る一次および/または二次エフェクター分子を発現せずに *in vivo* で増殖させ操作できる。細菌菌株の患者への導入の際には、シリプレッサーは正常な体温により不活化され、一次エフェクター分子および所望により二次エフェクター分子の発現が活性化される。

[0210]

エフェクター分子または融合タンパク質をコードする核酸配列の発現は、エフェクター分子が組換えDNA分子で形質転換された細菌において発現されるよう第2の核酸配列によって調節できる。例えば、エフェクター分子の発現は当技術分野で公知のいずれかのプロモーター/エンハンサーエレメントによって制御できる。プロモーター/エンハンサーは同種（すなわち、天然のもの）または異種（すなわち、天然のものでない）であってもよい。細菌におけるエフェクター分子、例えば、サイトカイン、または融合タンパク質の発現を制御するために使用できるプロモーターとしては、限定されるものではないが、 β -ラクタマーゼプロモーター（Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731）、または lac プロモーター（DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25; Scientific American, 1980, 242:74-94）などの原核生物プロモーターが挙げられる。本発明に包含されるその他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λP_R 、 λP_L 、trc、pagC、sulA、polII（dinA）、ruv、recA、uvrA、uvrB、uvrD、umuDC、lexA、cea、caa、およびrecNが挙げられる（例えば、Schnarrら, 1991, Biochimie 73:423-431参照）。好ましい実施形態では、プロモーターはtrcである（例えば、Amannら, 1988, Gene 69:301-15参照）。 10

[0211]

一次エフェクター分子がSOS応答性プロモーターの制御下で発現されるコリシンである特定の形態では、弱毒化細菌菌株をコリシンの発現が増加するようx線、紫外線、アルカリ化剤または別のDNA損傷剤で処理してもよい。例示的SOS応答性プロモーターとしては、限定されるものではないが、recA、sulA、umuC、dinA、ruv、uvrA、uvrB、uvrD、lexA、cea、caa、recNなどが挙げられる。 30

[0212]

もう1つの好ましい実施形態では、プロモーターは腫瘍環境において増大した活性を有する、例えば、pepT遺伝子のP1プロモーターなどの腫瘍の嫌気環境により活性化されるプロモーターである。P1プロモーターの活性化はFNR転写アクチベーターに依存している（Strauchら, 1985, J. Bacteriol. 156:743-751）。特定の形態では、P1プロモーターは嫌気条件下でpepT200プロモーターなどの天然のP1プロモーターよりも高レベルで誘導される変異体プロモーターであり、嫌気条件に応じてその活性がFNRではなくCRP-cAMPによって誘導される（Lombardoら, 1997, J. Bacteriol. 179:1909-1917）。もう1つの実施形態では、嫌氣的に誘導されるプロモーター、例えば、potABCDプロモーターを用いる。potABCDは嫌気条件下でpepTから分岐して発現されるオペロンである。pepT遺伝子においてこの発現にあずかっているプロモーターは単離されており（Lombardoら, 1997, J. Bacteriol. 179:1909-1917）、本発明の方法に従って使用できる。 40

[0213]

あるいは、プロモーターはTn10トランスポゾンのtetプロモーターなどの抗生物質誘導性プロモーターであってもよい。好ましい実施形態では、tetプロモーターは例えば三倍に多量化されている。次いで、プロモーター活性は本発明の弱毒化腫瘍標的細菌で治療された患者に適当な用量のテトラサイクリンを投与することによって誘導される。t 50

(56)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

et 誘導可能な発現系は最初にスチゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Faryar and Gatz, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) および哺乳類細胞 (Lang and Feingold, 1996, *Gene* 168:169-171) などの真核細胞系について記載されたが、最近の研究はその適用を細菌細胞にまで広げている。例えば、Stiegerら (1999, *Gene* 226:243-252) は *tet* プロモーターに機能しうる形で連結される場合の *tet* 誘導でホタルルシフェラーゼ遺伝子の 80 倍の誘導を示した。このプロモーターの利点は極めて低いレベルのテトラサイクリン、すなわち抗生物質活性に必要とされる用量の約 1/10 で誘導されるということである。

【0214】

ひとたび、エフェクター分子または融合タンパク質を含んでなるプラスミドを構築し、弱毒化腫瘍標的細菌に導入すれば、エフェクター分子発現または融合タンパク質発現は、限定するものではないが、生物学的活性、酵素活性、ノーザンブロット解析、およびウェスタンブロット解析をはじめとする当技術分野で公知のいずれかの方法によってアッセイできる (Sambrookら, 1989, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelら, 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, New York, NY 参照)。

【0215】

5. 7. 組合せ療法

ある実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために弱毒化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。あるその他の実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために 1 以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする 1 以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。例えば、1 以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする 1 以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を化学療法薬とともに使用してもよい。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびバクリタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼ I 阻害剤 (例えば、CPT-II、トポテカン、9-AC、および GG-211)、ゲムシタビン、ビノレルビン、オキサリプレチン、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコボリン、ビノレルビン、テモダール、サイトカラシン B、グラミジジン D、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。あるいは、1 以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする 1 以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を放射線療法 (例えば、 γ 線または x 線照射) とともに使用してもよい。治療される癌の種類によっていずれの放射線療法プロトコルを用いてもよい。例えば、限定されるものではないが、x 線を照射してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト (1 MeV エネルギー以上の照射) を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正中電圧 x 線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射活性アイソトープなどの γ 線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

【0216】

本発明は抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせを包含する。

【0217】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1 以上の抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと

(57)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

、これらの治療の二重作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

【0218】

本発明はまた抗癌剤と1以上のエフェクター分子および／または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的であるか相乗的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および／または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。

【0219】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗癌剤と、1以上のエフェクター分子および／または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌との組み合わせを包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもたらす。

【0220】

5. 8 送達のための方法および組成物

本発明は、宿主に対する毒性を低下させた弱毒化腫瘍標的細菌によって、宿主の全身に送達されれば有毒であり得る1以上の一次エフェクター分子を腫瘍に局所的に送達する方法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子は肉腫、リンパ腫、癌腫、またはその他の固形腫瘍癌を治療するのに有用である。ある限定するものではない実施形態では、エフェクター分子は腫瘍の部位での局所免疫応答の誘導に有用である。

【0221】

本発明によれば、1以上の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を含む弱毒化腫瘍標的細菌ベクターおよび所望により1以上の一次エフェクター分子を、固形腫瘍癌を有するヒト患者をはじめとする動物において腫瘍の増殖を阻害するか、腫瘍の容積を減少させるか、または腫瘍細胞の蔓延を防ぐ方法に用いるのが有利である。

【0222】

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。ある実施形態では、一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバー、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド、抗血管新生因子、腫瘍阻害酵素、またはその機能的断片である。

【0223】

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の治療のための本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子の送達法を提供する。

【0224】

(58)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌である。もう1つの実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は増強された放出系を含んでなる。好ましい実施形態では、動物は哺乳類である。高度に好ましい実施形態では、動物はヒトである。

【0225】

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、1以上の一次エフェクター分子と所望により1以上の二次エフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる一次エフェクター分子および/または所望により1以上の異なる二次エフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達も提供する。

【0226】

本発明はまたサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、本発明の1以上の融合タンパク質の送達を提供する。本発明はまた、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌によって送達される、本発明の1以上の融合タンパク質と所望により本発明の1以上のエフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる融合タンパク質および/または所望により1以上の異なるエフェクター分子を保持する、異なる弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせ送達を提供する。

【0227】

固形腫瘍としては、限定されるものではないが、肉腫、癌腫および限定されるものではないが生殖細胞系腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、神経膠腫、膀胱癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、および中皮腫をはじめとするその他の固形腫瘍癌が挙げられる。患者は好ましくは、限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ニワトリ、イヌ、ネコ、ウマなどのような動物をはじめとする動物であり、好ましくは哺乳類であり、最も好ましくはヒトである。本明細書において、固形腫瘍の治療とは、限定されるものではないが、腫瘍増殖を阻害すること、腫瘍細胞増殖を阻害すること、腫瘍容積を減少させること、または腫瘍細胞の身体その他の部分への蔓延（転移）を阻害することを含む。

【0228】

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0229】

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体ならびに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0230】

本発明はまた医薬上許容される担体および弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌バクテラならびに医薬上許容される担体を含んでなる。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌を含んでなる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1

(59)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌バクテラならびに医薬上許容される担体を含んでなる。

【0231】

特定の実施形態では、「医薬（製薬）上許容される」とは、連邦または州政府の監督官庁によって承認された、または米国薬局方もしくは動物、より詳しくはヒトに使用するためのその他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「担体」とはそれとともに治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。かかる医薬担体は水および、ピーナツ油、タイズ油、無機油、ゴマ油、オリーブ油などのような石油、動物、植物からのまたは合成起源のものをはじめとする油などの滅菌液体であってよい。医薬組成物が静脈投与される場合には生理食塩水が好ましい担体である。また、生理食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液は特に注射用溶液のための液体担体として使用できる。好適な医薬賦形剤としてはデンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は所望により少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐法性製剤などの形態をとり得る。経口製剤は医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準的な担体を含み得る。好適な医薬担体の例はE. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。かかる組成物は治療上有効な量の、精製された形態の治療用の弱毒化腫瘍標的細菌を、患者への適当な投与のための形態を提供する好適な量の担体とともに含む。製剤は投与様式に適合すべきである。

【0232】

好ましい実施形態では、組成物は慣例の手順に従ってヒト生命体への静脈投与に合わせた医薬組成物として処方される。典型的には、静脈投与用組成物は滅菌等張水性バッファ中の溶液である。必要であれば、組成物はまた沈殿防止剤および注射部位で痛みを和らげるにはリグノカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、成分は個別にまたは混合して単位用量形態で、例えば、有効薬剤の量を示すアンプルまたはサッシェなどの密閉容器中の凍結乾燥散剤または水を含まない濃縮物として供給される。組成物を点滴によって投与する場合には、滅菌医薬等級水または生理食塩水を含む点滴ボトルで調剤してもよい。組成物を注射によって投与する場合には、成分を投与前に混合できるよう注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0233】

固形腫瘍癌の治療または予防に有効である本発明の医薬組成物量は癌の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって決定できる。さらに、所望により最適な用量範囲を確認するのを補助するためにin vitroアッセイを使用してもよい。処方使用される正確な用量は投与経路、および癌の重症度によっても異なり、開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。しかしながら、一般には、好適な用量範囲は約1.0 c. f. u. / kgないし約 1×10^{10} c. f. u. / kg；所望により約1.0 c. f. u. / kgないし約 1×10^8 c. f. u. / kg；所望により約 1×10^2 c. f. u. / kgないし約 1×10^8 c. f. u. / kg；所望により約 1×10^4 c. f. u. / kgないし 1×10^8 c. f. u. / kg；および所望により約 1×10^4 c. f. u. / kgないし約 1×10^{10} c. f. u. / kgである。有効な用量はin vitroで得られる用量応答曲線または動物モデル試験系から推定できる。

【0234】

種々の送達系が知られており、本発明の医薬組成物を投与するために使用できる。導入方法としては、限定されるものではないが、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、くも膜下腔内、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられる。導入方法はまた腫瘍内（例えば、

(60)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

腫瘍領域への直接投与による)であってもよい。

【0235】

組成物はいずれの便宜な経路で、例えば、点滴またはボーラス投与によって、上皮または粘膜皮膚（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介する吸収によって投与してもよいし、その他の生物学的に活性な薬剤とともに投与してもよい。投与は全身性であっても局所であってもよい。さらに、本発明の医薬組成物を脳室内およびくも膜下腔内注射をはじめとするいずれかの好適な経路によって中枢神経系に導入することが望ましい場合もあり、脳室内注射は例えば、Ommayaリザーバーなどのリザーバーに取り付けた脳室内カテーテルによって容易になり得る。肺投与も例えば、吸入器または噴霧器およびエアロゾル化剤を含む処方の使用によって使用できる。

19

【0236】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましい場合もあり、これは例えば、限定されるものではないが、手術の際の局所注入、カテーテルによる注入、またはシアラストック (sialastic) 膜などの膜もしくは繊維をはじめとする多孔性、非多孔性、もしくはゼラチン状物質であるインプラントによって達成できる。ある実施形態では、悪性腫瘍または新生物もしくは新生物発生前組織の部位（または元の部位）に直接注射によって投与し得る。

【0237】

1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌は徐放システムで送達できる。本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も徐放システムで送達できる。ある実施形態では、ポンプを使用する場合もある (Langer, 上記; Sefton, CRC Crit. Rev. Biomed. Eng., 14:201 (1987); Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507; および Saudek ら, 1989, N. Engl. J. Med., 321:574 参照)。もう1つの実施形態では、高分子材料を使用する場合もある (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (編), CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (編), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61 (1983) 参照; Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol., 25:351; および Howardら, 1989, J. Neurosurg., 71:105 も参照)。さらにもう1つの実施形態では、徐放システムを治療標的、すなわち、全身用量の一部のみを必要とする脳の近くに置くこともできる (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, 2巻, 115-138頁 (1984) 参照)。

30

【0238】

その他の徐放システムは Langer (1990, Science 249:1527-1533) による総説で論じられており、1以上の一次エフェクター分子および所望により1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌の投与と関連して使用できる。

40

【0239】

本発明はまた本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医薬バックまたはキットを提供する。かかる容器に関しては、随意的に、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指示される形の通知がある場合もあり、この通知はヒト投与のための製造、使用または販売に関する機関による承認を反映している。

50

(61)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0240】

本発明はまた本発明の医薬組成物および少なくとも1種のその他の既知の癌治療をそれが必要とする動物に投与することを含んでなる固形腫瘍の治療法を提供する。特定の実施形態では、固形腫瘍癌の動物に本発明の医薬組成物および少なくとも1種の化学療法薬を投与する。化学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タキソールおよびパクリタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼⅠ阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-ACおよびGG-211）、ゲムシタビン、ビンORELビン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、ビンORELビン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン、ドキシルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサイトキサンが挙げられる。

15

【0241】

本発明は本発明の医薬組成物と化学療法薬などの抗癌剤の逐次または同時投与を含む。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与前に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月前）投与する。もう1つの特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤の投与後に（例えば、2時間、6時間、12時間、1日、4日、6日、12日、14日、1ヶ月または数ヶ月後）投与する。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を抗癌剤と同時に投与する。本発明は、相加的または相乗的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせを含む。

20

【0242】

本発明はまた、異なる作用部位を有する、抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌の組み合わせを含む。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一薬剤療法として用いられる薬剤のいずれかよりも向上した効力をもたらす。

30

【0243】

ある実施形態では、固形腫瘍癌の動物に本発明の医薬組成物を投与し、かつ、放射線療法（例えば、 γ 線またはx線照射）で治療する。特定の実施形態では、本発明は放射線療法では効果がないと示されている癌の治療法または予防法を提供する。医薬組成物は放射線療法と同時に投与してもよい。あるいは、放射線療法を本発明の医薬組成物の投与後に、好ましくは医薬組成物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヶ月、より好ましくは数ヶ月（例えば、3ヶ月まで）後に投与してもよい。

【0244】

本発明の医薬組成物の投与の前、同時、またはその後に投与される放射線療法は当技術分野で公知のいずれかの方法で投与できる。治療される癌の種類次第でいずれの放射線療法プロトコルを使用してもよい。例えば、限定されるものではないが、x線照射を投与してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト（1 MeVエネルギーより高い照射）を用いてもよく、皮膚癌には電子ビームおよび正中電圧x線照射を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素の放射性アイソトープなどの γ 線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。

40

【0245】

さらに、本発明はまた放射線療法があまりにも毒性を示すか、または示し得る、すなわち、治療を受けている患者にとって受け入れられないか、または耐えがたい副作用をもたらす場合に、放射線療法の代替として癌を医薬組成物で治療する方法を提供する。

50

(62)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0246】

5.9 本発明の医薬組成物の治療または予防有用性の証明

本発明の医薬組成物はヒトにおける使用に先立って所望の治療または予防活性について好ましくは *in vitro* で、次いで *in vivo* で試験される。例えば、特定の医薬組成物の投与が指示されるかどうか決定するために使用できる *in vitro* アッセイとしては、患者組織サンプルを培養で増殖させ、医薬組成物に曝露するか、あるいはこれを投与し、かかる組成物の組織サンプルに対する作用を観察する、*in vitro* 細胞培養アッセイが挙げられる。

【0247】

本発明の医薬組成物は免疫細胞を試験医薬組成物または対照と接触させ、試験医薬組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増大させる）能力を調べることによって、活性化された免疫細胞を増強するその能力について試験できる。試験組成物の免疫細胞の生物学的活性を調節する能力はサイトカインまたは抗原の発現を検出すること、免疫細胞の増殖を検出すること、シグナル伝達分子の活性化を検出すること、免疫細胞のエフェクター機能を検出すること、または免疫細胞の分化を検出することで評価できる。これらの活性の測定には当業者に公知の技術を使用できる。例えば、細胞増殖は³H-チミジン取込みアッセイおよびトリパンブルー細胞計数によってアッセイできる。サイトカインおよび抗原発現は、例えば、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、免疫組織化学放射免疫アッセイ、ELISA（酵素免疫吸着アッセイ）、「サンドウィッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A免疫アッセイおよびFACS解析などの技術を用いる競合アッセイおよび非競合アッセイ系をはじめとする免疫アッセイによってアッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイおよび電気移動度シフトアッセイ（EMSA）によってアッセイできる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、⁵¹Cr放出アッセイによって測定できる（例えば、Palladinoら、1987、Cancer Res, 47:5074-5079およびBlachereら、1993、J. Immunotherapy 14:352-356参照）。

【0248】

本発明の医薬組成物は癌を患う動物において腫瘍形成を低下させるその能力について試験できる。本発明の医薬組成物はまた固形腫瘍癌に関係する1以上の症状を軽減するその能力について試験できる。さらに、本発明の医薬組成物は固形腫瘍癌を患う患者の生存期間を延長するその能力について試験できる。当業者に公知の技術を用いて動物における本発明の医薬組成物の機能を分析できる。

【0249】

種々の特定実施形態では、固形腫瘍癌に関与する細胞種のうち代表的な細胞を用いて *in vitro* アッセイを実施し、本発明の医薬組成物がかかる細胞種に対して所望の作用を及ぼすかどうかを調べることができる。

【0250】

治療用の本発明の医薬組成物はヒトにおける試験に先立って、限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどをはじめとする好適な動物モデル系で試験できる。ヒトへの投与に先立つ *in vivo* 試験のために、当技術分野で公知のいずれの動物モデル系を用いてもよい。

【0251】

以下の一連の実施例は例示のために示されるのであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0252】

6. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるTNF- α の発現

以下の実施例は、TNFファミリーのメンバーをコードする核酸分子を含有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌などの細菌がTNFファミリーのメンバーを発現できることを証明す

(63)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

る。

【0253】

6. 1 TNF- α プラスミドの構築

本明細書に記載されるプラスミドは本発明の特定の実施形態の実施例を示すためのものである。当業者には明らかであろうが、*trc*プロモーターおよび/またはTNF- α をコードする核酸などのプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は当技術分野で公知の方法によってその他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子で置換してもよい。

【0254】

*trc*プロモーターを用いる、エフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、プラスミドT*rc99A* (Pharmaciaから市販されている) またはT*rcHisB* (In Vitrogenから市販されている) を用いた。両プラスミドとも開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くマルチプルクローニング部位を用いる。

【0255】

6. 1. 1. pCETプラスミド

二重 λ P_Lまたは λ P_Rプロモーターを用いるエフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく細菌による発現のために、以下のようにpCETプラスミドを構築した。プラスミドpCE33 (Elvinら, 1990, Gene 87:123-126) を逐次、制限酵素ClaIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素BamHIで切断した。次いで、得られた1.4 kbの断片を2.1 kbのpUC19 (GIBCOから市販されている) のSspI/BamHI断片に結合してプラスミドpCIを作製した。プラスミドpCIを制限酵素BamHIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とし、次いで制限酵素AflIIIで切断した。得られた3.1 kbのバンドを単離した。プラスミドT*rcHisB*を制限酵素ClaIで部分消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端とし、次いでAflIIIで切断した。次いで、得られたミニストロンおよびターミネーターを含む0.6 kbのバンドを3.1 kbのpCI断片に結合してプラスミドpCETを得た。pCETは、T*rc99A*またはT*rcHisB*と同様に、開始コドンとしてのNcoI部位とそれに続くT*rcHisB*マルチプルクローニング部位を用いる。 λ P_Lまたは λ P_Rプロモーターを含むいずれかのプラスミドを保持する細菌を30℃で増殖させた。

【0256】

6. 1. 2. pTSプラスミド

トランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のセリン原栄養性選抜を行う、pTSと示されるプラスミドを以下のように構築した。プラスミドpNK2883 (American Type Culture Collection (ATCC) から市販されている) を制限酵素BamHIで切断し、4.8 kbのバンドを単離した。配列GAAGATCTTCCGGAGGAGGGGAAATG (配列番号1) からなる正プライマーおよび配列CGGGATCCGAGCTCGAGGGGCCCGGGAAGGATCTAAGAAGATCC (配列番号2) からなる逆プライマーを用いるPCRによってネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株14028 (ATCCから市販されている) からネズミチフス菌*serC*をコードする核酸を単離した。PCR反応混合物を制限酵素BglIIおよびBamHIで切断し、1.1 kbのPCR産物を単離して4.8のpNK2883断片に結合してpTSと示されるプラスミドを得た。*serC*をコードする核酸のすぐ3'側にエフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクローニング部位が存在した。

【0257】

6. 1. 3. pTS-TNF- α プラスミド

*trc*プロモーターによって制御されるヒトTNF- α をコードする核酸のpTS媒介性染色体組込みのために、プラスミド(pTS-TNF- α)を以下のように構築した。プ

(64)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ラスミドPYA3332は、複製開始点がcolE1プラスミド（例えば、Bazara
1およびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406参照）の
複製開始点で置換されているASDプラスミドPYA272である（例えば、Curti
ss, IIIの米国特許第5,840,483号参照）。プラスミドPYA3332を制
限酵素NcoIで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とした。次いで、
平滑末端とした断片を制限酵素HindIIIで切断して3.3kbのDNA断片を単離
した。次いで、図1に示される大腸菌最適化ヒトTNF- α をコードする核酸（Penn
icaら, 1984 Nature 312:724-729;およびSalzman
ら, 1996, Cancer Biotherapy 11:145-153参照）を制
限酵素NdeIで切断し、T4DNAポリメラーゼで平滑末端とし、次いで、制限酵素H
indIIIで切断した。得られた0.5kbの断片を3.3kbのPYA3332断片
に結合してプラスミドAsd34TNF- α を得た。次いで、Asd34TNF- α を制
限酵素BglIIで切断し、trcプロモーターによって制御されるTNF- α をコード
する核酸をコードする1.1kbの断片をpTSのBamHI部位に結合してプラスミド
pTS-TNF- α を得た。

【0258】

6.1.4. pTS-BRPプラスミド

BRPをコードする核酸のトランスポゾン媒介性染色体組込みおよびエフェクター分子を
コードする核酸のセリン原栄養性選抜を行う、pTS-BRPと示されるプラスミドを以
下のように構築した。配列CCGACGCGTTGACACCTGAAACTGGAG
(配列番号5)からなる正プライマーおよび配列CCGACGCGTGAAAGGATC
TCAAGAAGATC (配列番号6)からなる逆プライマーを用いるPCRによってB
RPをコードする核酸をプラスミドpSWI (Bio101, Vista, CAから市
販されている)から単離してTOPO-TAクローニングプラスミド (Invitroge
n, Carlsbad, CAから市販されている)にクローニングしてpBRP#5
と示されるプラスミドを得た。プラスミドpBRP#5を制限酵素ApaIおよびBam
HIで切断し、得られたBRPをコードする核酸を含む0.6kbのバンドを5.9kb
のApaI/BamHI proto-pTS断片に結合してプラスミドpTS-BRP
を得た。エフェクター分子をコードする核酸の挿入のためのクローニング部位はBRPを
コードする核酸の5'および3'の両側に存在した。

【0259】

6.1.5. pTS-BRPTNF- α プラスミド

BRPおよびtrcプロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸のpT
S媒介性染色体組込みのために、プラスミド(pTS-BRPTNF- α)を以下の一
様に構築した。pTS-TNF- α の構築のために上記に記載したプラスミドAsd34T
NF- α を制限酵素BglIIで切断し、trcプロモーターによって制御されるTNF
- α をコードする核酸をコードする1.1kbの断片をpTS-BRPのBamHI部位
に結合してプラスミドpTS-BRPTNF- α を得た。

【0260】

6.2. エフェクター分子をコードする核酸のサルモネラ菌宿主染色体への組込み 本
明細書に記載される系は、セリンまたはグリシン栄養要求性の Δ serC-サルモネラ菌
株および活発に転写される領域への染色体組込みの際にセリン/グリシン原栄養性を回復
するプラスミドを用いる。しかしながら、染色体組込み体を選抜するためにその他の選択
マーカーを使用してもよいということは当技術分野では十分に知られており、かかるマ
ーカーは本発明の範囲内にある。例えば、Klecknerら, 1991, Meth.
Enzymol. 204:139-180参照。

【0261】

エフェクター分子をコードする核酸を含むpTSまたはpTS-BRPプラスミドを化学
的形質転換およびエレクトロポレーションをはじめとする当技術分野で十分に公知のいく
つかの手段によってserC-サルモネラ菌株に導入してもよい。エフェクター分子をコ

(65)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ードする核酸の導入後、サルモネラ菌をアンピシリン含有増殖培地で最小限2時間、より好ましくは6時間以上増殖させる。次いで、セリン原栄養性の細菌を選抜できる培地、例えば、M56培地、Atlas, R. M. 「Handbook of Microbiological Media」 L. C. Parks, 編, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993に細菌をおく。エフェクター分子をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌は選抜培地で増殖できる。次いで、エフェクター分子をコードする核酸の発現を以下に示されるように測定する。エフェクター分子をコードする核酸の発現は酵素活性、生物学的活性、ノーザンブロット解析、またはウェスタンブロット解析などの当業者に公知のいくつかの方法のいずれかで測定してもよい。

【0262】

10

6. 2. 1. サルモネラ菌によって発現されたTNF- α の送達および発現

上記のように、*trc*プロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸をpTS-BRPの*Bam*HI部位に挿入してpTS-BRPTNF- α と示されるプラスミドを得た。当技術分野で公知の標準的な方法によって、プラスミドpTS-BRPTNF- α を、遺伝形質が Δ *msbB*、 Δ *purI*、 Δ *serC* (図2)となるように*serC*-として構築したネズミチフス菌の弱毒化菌株、菌株VNP20009 (国際特許WO99/13053参照)にエレクトロポレーションした。メカニズムについて限定するものではないが、プラスミドの細菌ゲノムへの組込みにより*serC*をコードする核酸の活性化が可能となり、*serC*⁺表現型をもたらす。従って、エレクトロポレーションした細菌をアデニンを添加したM56寒天プレートにプレーティングすることでTNF- α をコードする核酸の染色体組込みを有する細菌を選抜した。細菌を、プラスミドの喪失および同時にプラスミドに基づくTNF- α 発現の喪失を示す、アンピシリン耐性の喪失についてさらに特性決定した。

20

【0263】

本発明の態様を標的とする細菌によるTNF- α の発現を調べて定量するために、TNF- α をコードする核酸の染色体組込みを有するサルモネラ菌を一晩増殖させ、培養物の測定したサンプルをウェスタンブロット解析に用いた。特に、pTS-BRPTNF- α クローン2と示される代表的な*serC*⁺アンピシリン感受性クローンからのTNF- α の発現が図3に示されている。ウェスタンブロット解析により、 3.9×10^7 cfuのpTS-BRPTNF- α クローン2細菌に相当する(レーン1)細菌タンパク質が50ngより多いTNF- α を発現するということが示され(レーン5)、このことは10ng/10⁷細菌より多いレベルでのTNF- α の発現を示唆する。従って、ヒトTNF- α は、サルモネラ菌において、染色体に組み込まれた、*trc*プロモーターによって制御されるTNF- α をコードする核酸から上手く発現された。

30

【0264】

7. OMPA融合タンパク質を発現する弱毒化腫瘍標的細菌

種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在化はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存している。例えば、タンパク質はタンパク質のアミノ末端へのシグナルペプチドの融合によって細菌の細胞周辺コンパートメントに局在化され得る。限定することはないが、周辺細胞質局在化は、細菌の成分(タンパク質など)が周囲の環境に放出されるために単一の膜のみを通過すればよいので、細菌の成分の放出を促進すると考えられている。対照的に、細胞質内局在化は、成分が周囲の環境に放出されるためには細菌の内膜と外膜の双方を通過することを要求する。さらに、特定のタンパク質の周辺細胞質局在化は生物学的活性を補助する場合もある。

40

【0265】

本発明のエフェクター分子を周辺細胞質に向けるためには当技術分野で公知の種々の方法を使用できる。本実施例はTNF- α 、TRAIL (TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド)、およびインターロイキン-2 (IL-2)などのエフェクター分子のアミノ末端へのompAシグナルペプチドの融合が周辺細胞質局在化とその後のタンパク質のプロセッシングをもたらすということを証明している。

50

(66)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0266】

7. 1. OMPA-TNF- α 融合タンパク質のプロセッシング

4種の異なるクローンにおけるTNF- α 発現、すなわちJM109細菌においてプラスミドに基づくtrcプロモーターによって動かされるompA-TNF- α 融合タンパク質の発現を全細胞溶解物のウェスタンブロット解析によって調べた。周辺細胞質に局在する酵素であるシグナルペプチダーゼによる前駆体融合タンパク質の成熟TNF- α への切断によって周辺細胞質局在が証明された。4種のクローンすべてにおいて、IPTGでの誘導後のTNF- α の過剰発現により、TNF- α が、プロセッシングされていない型とプロセッシングされた型の双方に対応する約20kdで移動する二重線として現れた(図5、レーン4~7)。比較のために、染色体に組み込まれたTNF- α をコードする核酸を有する成熟(プロセッシングされた)型のTNF- α を発現するサルモネラ菌株を正の対照として用いた(図5、レーン3)。TNF- α をコードする核酸を欠いている細菌ではTNF- α 発現は検出されなかった(図5、レーン2)。

10

【0267】

これらの結果は、成熟ヒトTNF- α タンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合(図4に示されるような)は大腸菌で発現される場合には周辺細胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明する。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは、正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TNF- α 融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということを示唆した。

20

【0268】

7. 2. OMPA-TRAIL融合タンパク質のプロセッシング

ompAシグナルペプチドのTNFファミリーのメンバーを周辺細胞質に局在させる能力を、TNFファミリーのもう1つのメンバーであるTRAIL(TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド)にまで拡張した。これらの実験のために、ヒトTRAIL(hTRAIL)の成熟型をコードする、trcプロモーターによって動かされるTRAILをコードする核酸をompAシグナルペプチドのコード配列に融合した(図6に示されるように)。一方はNcoI部位をコードし、もう一方はNdeI部位をコードする2種の異なるompA/TRAIL接合点を調べた(NdeIを含む配列については図6参照)。両種のクローンのウェスタン解析が図7に示されている。抗hTRAIL抗体を用いるウェスタンブロット解析によってNcoI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はhTRAILのプロセッシングされた型(28.2kd)とプロセッシングされていない型(30.2kd)の双方を発現し(図7、レーン2~4)、他方、NdeI接合したompA-TRAILを過剰発現する細菌はもっぱらプロセッシングされた型を発現する(図7、レーン4~7)ということが示され、このことはNdeI接合がより効率的なプロセッシングをもたらしたということを示唆する。

30

【0269】

これらの結果は、成熟ヒトTRAILタンパク質の大腸菌ompAシグナルペプチドへの融合は周辺細胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明した。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたompA-TRAIL融合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということを示唆した。

40

【0270】

7. 3. OMPA(IL-2)融合タンパク質のプロセッシング

二次エフェクター分子(IL-2)を融合タンパク質として発現させた。成熟(C125A)hIL-2の、TNF- α およびTRAILについて上記で用いたような、野生型ompAシグナル配列への融合ではIL-2のプロセッシングが可能にならなかった。ヒトIL-2サイトカインの周辺細胞質局在およびプロセッシングを調べるために、成熟ヒト(

50

(67)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

C125A) IL-2を図8に示されるように、ompA(8L)と示される改変ompAシグナルペプチドに融合させた。改変ompAシグナルペプチドはompAシグナルのアミノ酸6~17を図8に示されるもので置換することによって改変した。発現およびプロセッシングが図9に示されている(レーン6および7)。各レーンは単一のクローンを表す。ウェスタンブロット解析の結果はompA(8L)シグナルペプチドを用いることで、事実上完全なプロセッシングが認められるということを示した(図9、レーン6および7)。

【0271】

7. 4. PHOA(8L)-IL-2融合タンパク質のプロセッシング

ヒトIL-2の周辺細胞質局在およびプロセッシングについて第2の融合タンパク質を調べ、7. 3. 節の融合タンパク質と比較した。図10中で、phoA(8L)と示される改変phoAシグナルペプチドに融合した成熟ヒト(C125A)IL-2の発現およびプロセッシングを調べた。発現およびプロセッシングが図9に示されている。ompA(8L)シグナルペプチドを用いてより完全なプロセッシングが認められたのに対し(図9、レーン6および7)、合成phoA(8L)シグナルペプチドでは部分的なプロセッシングしか認められなかった(図9、レーン4および5)。

【0272】

これらの結果はIL-2の局在およびプロセッシングが異なるシグナルペプチドによって提供されたということを示す。この結果はまた、種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存しているということを示す。

【0273】

融合タンパク質研究の結果は、IL-2などの本発明の二次エフェクタータンパク質はOmpAまたはPhoAなどのタンパク質シグナルペプチドとの融合によって発現され、細菌の周辺細胞質に局在され得るということを示す。当業者には明らかであろうが、その他のシグナル配列を用いて利用され得るエフェクター分子の周辺細胞質局在を引き起こすこともできる。当業者にはさらに明らかであろうが、本発明のその他のエフェクター分子を本明細書の実施例に記載されるエフェクター分子と置換することもできる。

【0274】

8. 実施例：成熟型のTNF- α を発現するサルモネラ(Δ MSBB、 Δ PURI)の抗腫瘍効果

以下の実験は、一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーのメンバー)をコードする核酸を含むサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌は哺乳類腫瘍に一次エフェクターを送達することができ、腫瘍体積を減少させることを証明する。

【0275】

TNF- α のネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)の抗腫瘍効果高める能力は段階的なネズミ大腸38癌腫モデルで評価した。これらの実験では、大腸38癌腫由来の1mm³の腫瘍断片をC57BL/6マウス腫瘍へ移植し、腫瘍を平均サイズ約0.3gまで増殖させ、この時、動物を以下の処理群(n=10)に無作為に配置した：1) 無処理；2) ネズミチフス菌(Δ msbB、 Δ purI、serC)(親株)；および3) pTS-ERPTNF- α (上記の大腸2)。各群のマウスは処理しないか、あるいは適当な細菌株 1×10^6 cfuの静脈注射を1回施した。細菌接種時から始め、毎週腫瘍サイズを測定した。

【0276】

TNF- α を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラを施した群では、処理後2週間で腫瘍の退縮が明白であり、処理後4週間以内に動物のうち6個体で完全な退縮が見られた(図11)。無処理群では腫瘍は徐々に大きくなったが、ネズミチフス菌親株(Δ msbB、 Δ purI、serC)で処理した群の腫瘍は処理後3ないし4週の間に部分的退縮を示したが、その後徐々に大きくなった(図11)。

【0277】

(68)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

これらの結果は、弱毒化腫瘍標的サルモネラがTNFファミリーのメンバーなどのエフェクター分子を発現して腫瘍へ送達できることを証明するものである。このようなサルモネラは腫瘍の治療に有用であり、TNFファミリーのメンバーを発現しないサルモネラ親株と比較して腫瘍退縮の結果を増強する。

【0278】

染色体に組み込まれた核酸からTNF- α を発現するサルモネラにより完全な腫瘍退縮が示されることは、染色体に組み込まれたエフェクター分子をコードするからから生物学的に有効な発現が生じるということを示す。

【0279】

9. 実施例：BRPを発現する細菌による核酸分子の送達の増強

10

BRP活性がサルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌からのプラスミドの放出を増強することを示すため、プラスミドならびに放出マーカー（AMPマーカーを有するpTrc99a）として用いられる第2のプラスミドにBRPを含んだ弱毒化腫瘍標的サルモネラ株を構築した。BRPの活性を評価するため、BRPを含む、あるいは含まないサルモネラを標準法による培養で増殖させた。次に得られた上清から遠心分離および濾過によって残存する細菌を除去した後、明澄な上清をコンピテント細胞に加え、形質転換反応を行った。次にこれらのレシピエント細胞をLB amp培地で平板培養し、AMPマーカープラスミドの取り込みを調べた。BRPを有するAMP耐性コロニー数が増加していれば、より多くのプラスミドがBRP発現株から培地へ放出されたことを示す。

【0280】

20

結果は以下の表2に要約されている。

【0281】

【表2】

プラスミド	AMPの平均数 コロニー／形質転換
pTrc99a 単独	125
pTrc99a+BRP (pSW1)	388

【0282】

これらの結果はBRPが存在すると培地へ分泌されるampプラスミドの量が増えたことを示している。このように、BRP発現細胞由来上清の「レシピエント細胞」への形質転換ではコロニー数が増える。これらの結果は、BRPが核酸プラスミドを含む二次エフェクター分子の放出を増強したことを示す。従って、これらの結果は、BRPがプラスミドの放出またはDNA送達に有用であることを示す。さらに、BRPを発現し、DNAを送達することができるこれらのサルモネラ株は集団として複製能を留めていた。

【0283】

10. 実施例：BRP発現は弱毒化腫瘍標的サルモネラの腫瘍標的化能または腫瘍阻害能を損なわない

以下の実施例は、弱毒化腫瘍標的細菌が1以上のエフェクター分子と共にBRPを発現するよう操作して細菌の腫瘍標的能を阻害することなくエフェクター分子の腫瘍への送達を増強することができることを示す。

【0284】

固形腫瘍モデルはB16メラノーマ細胞をC57BL/6マウスの右後脚の腿に皮下注射することで得た。腫瘍の移植のために、トリプシン処理によりフラスコから細胞を解離させ、洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水に 2.5×10^6 細胞/mlで懸濁させた。細胞懸濁液0.2mlアリコート（総数 5×10^6 細胞/マウス）を第0日目に注射した。腫瘍の体積が150ないし200mm³に達した際（移植後約10日）、マウスを無作為に10個体の群に分け、各群に異なる処理を施した。対照群（図12の曲線#1）には0.2mlのPBSを施した。別の群にはサルモネラVNP20009の弱毒化腫瘍標的株 2×10^6 c. f. u. /マウスを含有する0.2mlを施した（図12の曲線#2）。第3の

50

(69)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

群には、その天然プロモーターの制御下にBRP遺伝子を含むプラスミドであるpSW1を含む弱毒化腫瘍標的サルモネラ株 2×10^8 c. f. u. /マウスを含有する0.2 mlを施した(図12の曲線#3)。BRP遺伝子は大腸菌内ではSOS誘導性である。しかしながら本発明者らは、メカニズムは特定できないが、BRP遺伝子はサルモネラ菌内では部分的に構成的であり、低レベルから中レベルのBRPタンパク質を産生するが、腫瘍環境におけるSOSの性質によってその産生はさらに増強すると信じている。BRP発現VNP20009サルモネラを注射したマウスは非BRP発現VNP20009を注射したものとはほぼ同様の抗腫瘍応答を示したが、このことはこれらのサルモネラ菌の生存または腫瘍標的化能がBRPの発現によって変化しないし、腫瘍増殖阻害能も変化しないことを示している。弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌におけるBRP発現の結果は分泌型HSV

10

【0285】

11. 実施例：pepTプロモーター発現運搬体

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌におけるpepTプロモーターの制御下、 β -galなどのレポーターをコードする核酸分子の*in vitro*および*in vivo*発現を示す。

20

【0286】

11.1 実施例：pepT-BRP- β GAL発現プラスミドの構築

pepTプロモーターは、以下のプライマー：

フォワード：5'-AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC GG-3' (配列番号15)

リバーズ：5'-AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C-3' (配列番号16)

を用いて、単離した野生型ネズミチフス菌(ATCC14028)のコロニー由来の領域のPCR増幅によりクローニングした。

【0287】

30

PCR条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、65℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。このPCR産物をPCR2.1クローニングベクター(Invitrogen, Carlsbad, California)へクローニングし、PepT/PCR2.1と名付けた。

【0288】

このPepT/PCR2.1ベクターをNcoIおよびXbaIで切断した。PepT断片をゲルで単離し、同じ酵素で切断した β -gal Ztermベクターへ連結した。Zterm(Temporary Genbank Bankit No. 296495)は、 β GALオープンリーディングフレームをpUC19へクローニングすることによって作製されたプロモーターのない β -galプラスミドである。得られたプラスミドをpepT- β GALと名付けた。

40

【0289】

11.2 pepT- β GALの*in vitro*発現とpepT- β GAL活性の測定

pepT- β GALを担持するサルモネラ株YS1456(図13AのCC14；この菌株の遺伝構成についてはWO96/40238参照)またはVNP20009(図13AのCC16)を嫌気または好気条件のいずれかの下でOD₆₀₀が~0.5ないし0.8まで増殖させた。 β -gal活性はBirgeおよびLow(1974, J. Mol.

Biol. 83:447-457)の方法で測定した。結果は図13Aに示しているが、嫌気条件下での細菌の増殖時の β -gal活性が約14ないし24倍誘導されたことを

50

(70)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

示す。

【0290】

11.3 pepT- β GALのin vivo発現とpepT- β GAL活性の測定
 pepT- β gal発現プラスミド、BRP発現プラスミド(BIO101由来のpSW1 (Vista, California)、これはその天然プロモーターの制御下にpC10DF13 BRPコード配列を含む)、または双方の発現プラスミドを担持するサルモネラ株YS1456の細胞を腫瘍担持マウスに静脈注射した。注射後5日目に腫瘍および肝臓をホモジナイズし、細菌を単離してpepT- β galおよび/またはBRPのプラスミドの存在がこれらの細菌の腫瘍標的化能を阻害しなかったことを示した。さらに、腫瘍および肝臓ホモジネートを用いて β -gal活性を測定し、活性型 β -galがin vivoで測定可能かどうか、またpepTプロモーターが嫌気性腫瘍環境において誘導されるかどうかを調べた。結果は図13Bに示されており、腫瘍環境における極めて高レベルのpepTプロモーター活性を示す。バックグラウンドレベルに対して肝臓の β -gal発現における有意な増強は見られず、これは好気性の肝臓環境におけるpepTプロモーターの低活性および/または細菌ベクターの肝臓への標的化能が低いことに帰因するものと思われる。

【0291】

12. 実施例：テトラサイクリン誘導発現系

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌のtetプロモーターの制御下にある β -galなどのリポーター遺伝子をコードする核酸分子の発現を示す。

【0292】

tetプロモーターは以下のプライマー：

フォワード：5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG-3' (配列番号17)

リバース：5'-GGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C-3' (配列番号18)

を用いてPCR増幅によりミニ-TN10トランスポゾンからクローニングした。

【0293】

PCR条件は以下の通りであった：95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクル。

【0294】

~400bpのPCR断片をゲルで単離し、PCR2.1ベクター(Invitrogen)にクローニングした。PCR2.1/tetプロモーターベクターをNcoIおよびBamHIで切断した。この~400bpのtetプロモーター断片をゲル単離し、同じ2酵素で切断したプロモーターのない β -galベクター-Ztermに連結した。連結混合物を形質転換し、形質転換した細菌をテトラサイクリン/X-galプレート上で平板培養した。陽性コロニーを青色を基に単離した。いくつかの陽性コロニーからの抽出物を作製し、BirgeおよびLow (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457)の方法によりテトラサイクリンの存在下での β -gal活性に関してアッセイした。1つのクローンを単離し、一定の範囲のテトラサイクリン濃度にわたって β -gal発現に関してアッセイした。アッセイの結果はテトラサイクリンによって用量依存的に β -gal活性が誘導されることを示し、図14に示されている。

【0295】

13. 実施例：エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による腫瘍増殖の阻害

以下の実施例はエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の作製、およびin vivoにおけるかかるサルモネラ菌による腫瘍治療の効果を示す。

【0296】

13.1 エンドスタチン発現プラスミドの構築

(71)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

エンドスタチンは、以下のプライマー：

フォワード：5' -GTG TCC ATG GGG CAC AGC CAC CGC GAC
TTC CAG-3' (配列番号19)

リバーズ：5' -ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC T-3' (配列番号20)

を用いてヒト胎盤cDNAライブラリーからPCR増幅した。

【0297】

得られたPCR産物をPCR2.1ベクター (Invitrogen) へクローニングした。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは以下のプライマー：

フォワード：5' -GTG TCC ATG GCT CGG CGG GCA AGT GTC
GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC C 19

AC CGC GAC TTC-3' (配列番号21)

リバーズ：5' -GTG CGG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA
TGA AGC TG-3' (配列番号22)

とともに、鑄型として上記で構築したプラスミドを用いてPCR増幅した。

【0298】

PCR増幅条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間を30サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。

【0299】

得られた産物はそのアミノ末端にペプチド配列MARRASVGT DHHHHHH (配列番号23) を有するヒトエンドスタチンをコードするNco I (5') およびBamHI (3') 制限部位を持つDNA断片であった。 20

【0300】

このPCR産物をNco IおよびBamHIで切断し、550bpの産物をゲルで単離し、同じ酵素で予め切断したpTrec99Aベクターへ連結した。この連結反応産物を大腸菌DH5αおよび弱毒化腫瘍標的サルモネラ株VNP20009へ形質転換した。

【0301】

ヘキサヒスチジン-エンドスタチンコード配列もまた、Nco I/BamHI断片として発現ベクターYA3334にクローニングした。YA3334はColEIの複製起点に置き換えられた複製起点を有する (BazaralおよびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406) asdプラスミドPYA272 (Curtis III, 米国特許第5,840,483号) である。陽性クローンから調製したプラスミドDNAを単離し、サルモネラ株8324へ形質転換し、これがasd変異を有するVNP20009である。この菌株はCurtis III (米国特許第5,840,483号) に記載の方法に従って作製した。 30

【0302】

13.2 弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるエンドスタチンの*in vitro*発現
pTrec99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチンプラスミドを含む種々のサルモネラ菌VNP20009株および大腸菌DH5α株を対数増殖中期 (O.D.。。。が~0.6ないし0.8) まで増殖させ、この時点で各培養物を分割し、一方には*trc*プロモーター活性の誘導のために0.1mM IPTGを施し、もう一方にはIPTGは施さなかった。さらに3時間増殖させた後、細菌抽出物を調製し、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンの発現を抗ヒスチジン抗体 (Clontech, Palo Alto, California) を用いてウェスタンブロット解析により確認した。図15Aおよび15Bはそれぞれ大腸菌DH5αおよびサルモネラ菌VNP20009におけるpTrec99A-ヘキサヒスチジン-エンドスタチン (HexHIS-エンドスタチン) の発現を示すウェスタンブロットの結果を示している。*trc*プロモーターはIPTGの不在下の大腸菌では活性は見られなかったが、同じプロモーターがサルモネラ菌では構造的に活性であった。ヘキサヒスチジン-エンドスタチンは約25kDの単一のバンドで現れ、これがこの融 50

(72)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

合タンパク質の推定分子量である。

【0303】

ヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質は同様に、発現の支配に *t r c* プロモーターを利用する Y A 3 3 3 4 プラスミドからも発現した。図 1 6 に示されているように抗ヒスチジン抗体を用いて推定分子量 25 kDa のタンパク質を検出した。図 1 6 では、サンプルが由来する全ての細菌培養物を 0.1 mM IPTG で 3 時間誘導した。

【0304】

1.3.3 C38 ネズミ大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の効果

2×2×2 mm³ の体積の大腸 38 腫瘍断片を 9 週齢の雌 C 5 7 B L / 6 マウスに皮下移植した。腫瘍体積が 1000 mm³ に達した際、それらを摘出し、2×2×2 mm³ の断片に切断した。これらの断片をもう 1 回一連のサイクルを終らせ、得られた 2×2×2 mm³ の断片を雌 C 5 7 B L / 6 マウスの右腿に皮下移植した。腫瘍体積が 150 ないし 200 mm³ に達した際（移植後約 24 日後）、マウスを 10 個体 6 群に無作為に分け、各群に異なる処理を施した。1 つの対照群には 0.2 ml の PBS を施した。もう 1 つの対照群には対照 *a s d* プラスミド（すなわち、上記第 5. 6 に記載のように *a s d* プラスミドは挿入されていない）を有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌株 VNP 20009 を 1×10⁶ c. f. u. 含む 0.2 ml を施した。第 1 の実験群には *a s d* プラスミドにおいてヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質を発現する VNP 20009 を 1×10⁶ c. f. u. 含む 0.2 ml を施した。第 2 の実験群には第 1 の群と同じ発現構築物およびさらに発現される BRP を有する VNP 20009 を施した。

【0305】

図 1 7 はこれらの実験の結果を示したものであり、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現する VNP 20009 株のよる腫瘍抑制の効果を示す。処理後 60 日では、エンドスタチンを発現する VNP 20009 サルモネラ菌の腫瘍サイズ中間値は、対照動物の腫瘍サイズ中間値の約 13 % であり、空のベクターを担持する VNP 20009 サルモネラ菌で処理した動物の腫瘍サイズ中間値より 30 % 以上低かった。生き残った動物のうちの多くが、正味の腫瘍サイズの小さな変化によって示されるように腫瘍増殖にほとんど変化が無いことを示し、あるものは強い腫瘍抑制を示した。処理の浸透または効果が不十分なことが、エンドスタチン送達系が不十分であることに反映されている可能性が最も高い。このことは、エンドスタチンが封入体に集積することを見出している O' Reilly ら（1997, Cell 88: 277-285）と合致する。エンドスタチン送達系は BRP の発現によって増強される。BRP の発現はその天然プロモーターによって制御されるが、通常は細菌で SOS 応答を示す。BRP 発現は対照集団の平均腫瘍体積の約 6 % まで平均腫瘍体積を小さくすることが示された。さらに、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンおよび BRP で処理したマウス集団では、数個体のマウスが経時的に腫瘍体積に著しい減少を示し、腫瘍体積は最初の腫瘍体積の約 10 以下まで退縮した。BRP の効果は二重であると考えられ、1 つは BRP 自体が抗腫瘍活性を有すること、もう 1 つは BRP が周辺細胞質内容物の放出、およびエンドスタチンをはじめ細胞質内容物の放出をある程度は促進し、これが封入体でタンパク質が集積するのを防ぐということである。

【0306】

1.3.4 DLD ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の効果

対数増殖期まで増殖させた DLD 1 細胞培養物にトリプシン処理を施し、PBS で洗浄し、PBS 中 5×10⁷ 細胞/ml の懸濁液を再構成した。各々 5×10⁶ 細胞を含む単一の細胞懸濁液のアリコート 0.1 ml を 9 週齢の雌ヌードマウス（Charles River からの Nu/Nu-CD1）の右腿に皮下注射した。マウスを各 10 個体 3 群に無作為に分けた後、注射後 10 ないし 15 日、または腫瘍体積が 200 ないし 400 mm³ に達するまで同期化した。

【0307】

(73)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

第1群のマウスは対照群であり、各々に0.3mlのPBS注射を施した。第2群のマウスには対照asdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP2を 0.009×10^6 c. f. u. 含む0.3mlを施した。第3群のマウスにはヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンパク質およびBRPを発現するasdプラスミドを担持する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌VNP20009を 1×10^6 c. f. u. 含む0.3mlを施した。腫瘍をモニターし、1週間に2回測定した。図13は3処理の投与後の腫瘍体積をグラフで表したものであり、DLD1ヒト大腸癌の増殖に対する、ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の抑制作用が示されている。

【0308】

空のベクターPYA3332を担持するVNP20009は腫瘍増殖を有意に阻害することとはできなかった。しかし、エンドスタチンおよびBRPを発現するVNP20009は腫瘍増殖を阻害することができた。これらの結果は、エンドスタチンとBRPの組合せがPYA3332ベクターを担持するVNP20009(8324株)のいずれかの抗腫瘍作用を増強することを示している。

【0309】

14. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌による抗血管新生因子の発現
以下の実施例は、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌を、抗血管新生因子トロンボスポンジンAHR、血小板第4因子およびアポミグレンを発現するように操作するために用いられる方法論を示す。

【0310】

14.1 トロンボスポンジンAHRをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築
トロンボスポンジンの抗血管新生相同領域(AHR)に相当するペプチド配列TIP13.40: AYRWRLSHRPKTGFIRVVMYEG(配列番号24)(例えば、特許出願第C07K-14/78参照)を逆転写し、サルモネラ菌での発現のためにコードの最適化を行い、DNA配列:

GCG TAC CGC TGG CGC CTG TCC CAT CGC CCG AAA A
CC GGC TTT ATC CGC GTG GTG ATG TAC GAA GGC(配列
番号25)を得た。このペプチドを合成するため相補的オリゴヌクレオチド(オリゴ13
:40-1およびオリゴ13:40-2)を作製した。5'末端において、OMPAのプロ
セッシング領域をコードする配列およびSpeI制限部位を付加した。3'末端におい
て、BamHI制限部位とともに停止コドン(Stop)を付加した。この2つのオリゴをアニーリ
ングして二本鎖DNA断片を作製した。このDNA断片をSpeI/BamHIで切断し、
SpeI/BamHI切断ベクターpTrec801IL2に連結して、全長改変OmpA
リーダー配列を含むプラスミドpTrec801-13.40を作製した。プロセッシング
されると、この配列は完全長の13.40トロンボスポンジンペプチドとなる。

【0311】

オリゴ 13.40-1

5'gtgtactagtgtgacgcagcgcgCGGTACCGCTGGCGCCTGTCCCATCGCCCGAAAACC
GGCTTTATCCGCGTGCTGATGTACGAAGGCTAAGgacgcgcgc3'(配列番号26)

オリゴ 13.40-2

5'ggcgagatccTTAGCCTTCGTACATCACCAACGCGGATAAAGCCGCTTTTCGGGC
GATGGGACAGGCGCCAGCGGTACGCcgcctgacgcgcacactagacac3'(配列番号27)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0312】

14.2 血小板第4因子ペプチド(47-70)をコードする核酸配列を含むプラスミ
ドの構築

血小板第4因子(PF-4; 例えばMaconeら, 1990, Science 24 50

(74)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

7:77-79およびJouanら, 1999, Blood 94:984-993参照)のC末端のアミノ酸残基47-70からなるペプチドを、サルモネラ菌での発現のためにコドンの最適化を行った。以下に示されるこのペプチドは、CFU-GM始原細胞上でPF-4の活性阻害に関与するDLQモチーフおよび主なヘパリン結合ドメインである塩基性アミノ酸クラスターを含む。

【0313】

血小板第4因子:

MSSAAGFCASRPGLLFLGLLLPLVYAFASAEAEEDGDLOCLCVKTTTSQV

RFRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLOAPLYKKIKKLLS

(配列番号 28)

10

シグナルペプチド=下線・太字

Lys 61、62、65、66=主なヘパリン結合ドメイン (太字)

DLQ (7-9、54-56) = CFU-GM始原細胞に対する阻害活性 (太字)

【0314】

このペプチドを合成するため、相補的オリゴヌクレオチド (オリゴPF4-1およびオリゴPF4-2) を作製した。5' 末端においてOmpAおよびSpeI制限部位のプロセッシング領域コードする配列を付加した。3' 末端において、BamHI制限部位とともに停止コドン付加した。この2つのオリゴをアニーリングして二本鎖DNA断片を作製した。制限切断した後、この断片をSpeI/BamHIで制限処理したベクターpTrec801に連結してプラスミドpTrec801-PF4を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長のPF-4 (47-70) ペプチドとなる。

【0315】

オリゴPF4-1

5'cttaccatagtgccgcaagcgAACGGCCGCAAAATCTGCCTGGACCTGCAGGCGCCGCT

GTACAAAAAAATCATCAAAAACTGCTGGAAAGCTAA ggatcc gcg3' (配列番号 29)

30

オリゴPF4-2

5'cgcggatccTTAGCTTTCAGCAGTTTITTTGATGATTTTTTGTACAGCGGCGCCTG

CAGGTCCAGGCAGATTTTGCGGCCGTTcgcctcgcgcacactagtgag3' (配列番号 30)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0316】

14.3 アボミグレンをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

抗血管新生ペプチドアボミグレン

(IYSFDGRDIMTDPSWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAW 40
RTADTAVTGLASPLSTGKILDKAYSCANRLIVLCIENSF
MTDARK (配列番号 31); 例えば、国際公報WO99/29856参照)はコラーゲンXVのタンパク質分解断片であるレスチンのC末端に相当する。オリゴヌクレオチド (オリゴApom5FおよびオリゴApom6F) を、ヒトcDNA由来のDNA断片を増幅するように設計した。5' 末端において、OmpAのプロセッシング領域をコードする配列およびSpeI制限部位を付加した。3' 末端において、BamHI制限部位とともに停止コドン付加した。

【0317】

(75)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

オリゴ Apom5F: 5'-ggcttc actag/ gggcccaagcg ATATACTCCTTTGATGGTCG -3'.

(配列番号 32)

オリゴ Apom6R: 5'-cgc ggatcc TTACTTCCTAGCGTCTGTCATGAAACTG -3'

(配列番号 33)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す)

【0318】

10

正確なサイズの断片を、鋳型として胎盤cDNAを用いてPCRによって得た。PCR産物をSpeI/BamHIで切断し、改変ompAシグナル配列を含むSpeI/BamHIで制限処理したベクターpTrec801に連結してプラスミドpTrec801-Apomを作製した。プロセッシングされると、この配列はアポミグレンペプチドとなる。

【0319】

14.4 内皮細胞増殖を阻害するサルモネラ菌によって産生される抗血管新生ペプチド pTrecOmpA-エンドスタチン、pTrec801-PF4およびpTrec801-13.40プラスミドを弱毒化腫瘍標的サルモネラVNP20009株にエレクトロポレートした。pTrecOmpA-エンドスタチン、pTrec801-PF4およびpTrec801-13.40を発現するサルモネラ株を、Feldmanら、2000, *Cancer Res.* 60:1503-1506およびBleznigerら、1999, *Nature Biotech.* 17:343-348により記載されてように、抗増殖活性に関してスクリーニングした。各コロニーの培養物5mlを4時間増殖させた。100mg/mlゲンタマイシンを含有する1/20容量のHUVEC培地に細胞ペレットを再懸濁させ、3回連続して凍結/解凍サイクルを行うことで細胞溶菌液を作製した。この溶菌液を遠心分離して明澄化し、0.2mmのシリンジフィルターを用いて濾過除菌した。この溶菌液25または50mlを、100ml基本培地2%FCSおよび10ng/ml FGFを含有する96ウェルプレート中のヒト静脈内皮細胞(HUVEC)に添加した。対照として空のpTrecベクターを含むサルモネラ菌を用いた。プレートを72時間インキュベートし、増殖をMTSアッセイによって測定した(Mosmanら、1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63)。

20

30

【0320】

図19および20で得られた予備的結果は、サルモネラ菌によって産生された血小板第4因子ペプチド(PF4-2)、トロンボスポンジンペプチド13.40(13.40-3)およびエンドスタチンが40ないし60%の抗増殖活性を有すると思われることが示される。

【0321】

15. 実施例：弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるバクテリオシンファミリーのメンバーの発現

この実施例はバクテリオシンファミリーのメンバーをコードする核酸を含む、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌がバクテリオシンファミリーのメンバーを発現することができることを示す。

【0322】

15.1 COLE3プラスミドの構築

本明細書に記載のプラスミドは本発明の特定の実施形態の例を示すものである。当業者には明らかなように、trecプロモーターおよび/またはバクテリオシンをコードする核酸のようなプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は、当業者に公知の方法によって他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子と置き換えてもよい。

【0323】

15.1.1. pE3. シャトル-1(shuttle-1)中間体ベクタープラスミド

50

(76)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ド

pE3. シャトル-1は、複数のクローニング部位及びプラスミドベクターColE3-CA38（配列番号34）中へのクローニング／選択のためのlacZ断片を含むカセットを作製するために用いられる中間体ベクターを示す。BRPのE3へのクローニングを容易にするために、BRPを先ず中間体シャトルベクター上にクローニングした（図21）。このベクターは、染色体lacZ中の突然変異（群）を有する細菌株中のラクトースに関してクローンを選択するために使用できるlacZ断片を含んでいる。次いで、BRP断片を、lacZ α 相補性断片を含むカセットとして、E3プラスミドSmaI部位（図22）中にクローニングした。lacZ断片によって、このステップにおけるインサートの選択（すなわち、Lac+）が可能になる。天然に存在するE3プラスミドは、抗生物質選択マーカーを有していない（図23）が、プラスミドの存在の選択は、ハローアッセイ（halo assay; Pugsley, A. P. 及びOudega, B.、"コリシン類及びそれらのプラスミドの研究方法（Methods for Studying Colicins and Their Plasmids）"、[Plasmids, a Practical Approach] 1987、K. G. Hardy編集；Gilson, L. ら、EMBO J. 9:3875-3884）を用いることによって可能である。このシャトルベクターは、BRPのE3プラスミド上へのクローニングだけでなく、E3又はE3/BRPと組み合わせうる任意のDNAのクローニングをも容易にするはずである。次いで、新規なE3/BRPプラスミドを、41. 2. 9中に形質転換し、活性を試験した。予備的なハロー形成アッセイ（halo forming assay）によって、プラスミド上のBRPの存在が、この株のE3を産生する能力を妨害しないことが証明された。41. 2. 9 E3/BRPが、41. 2. 9 E3を超えて活性を増大させたか否かを判定するため、各株によって産生されたE3の致死ユニット量を測定した（図24）。41. 2. 9 E3/BRPは、41. 2. 9 E3単独よりも100%多い致死ユニットを産生し、これにより、この株が41. 2. 9 E3単独を超える増大した活性を有することが証明された。

【0324】

15. 1. 2. E3活性に関するハロー「穿刺」アッセイ（halo "stab" assay）

感受性試験株（SK522）を、OD₆₀₀が0.8になるまで増殖させる。試験株100 μ lを、（100 \times 15mmディッシュに対して）3mlの加温した（約55 $^{\circ}$ C）LB軟寒天に添加し、素早くLB寒天プレート上に注ぐ。このプレートを穏やかに揺とうしてプレート全体に均一に広げ、寒天を10～15分間かけて固化させる。E3活性アッセイが望まれる大腸菌又はサルモネラ（Salmonella）のコロニーを、滅菌したつまようじ（toothpick）で単離し、寒天中に「穿刺（stabbed）」する。次いで、この寒天プレートを、逆さまにして37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。次の日、分泌されたコリシンE3が感受性株を殺傷するので、ハロー又は透明領域（clearing zone）がE3穿刺の周囲に現れる。コロニーは、さらに誘導されて、アルキル化剤（例えば、マイトマイシン）、紫外線又はX線などの多様なSOS誘導試薬のいずれかによる処理によって、E3の産生又は分泌を増加させることができる。

【0325】

1つのハローアッセイの結果を図25に示す。ある細菌株がペトリ皿上の細菌集（lawn）上で増殖した感受性株の存在下でコリシンを分泌すると、分泌されたコリシンは、外側に広がり（diffuses out）、細菌集中に含まれている細菌細胞を殺傷し、それらを溶解して透明領域又はハローを作り出す。ハローの大きさは、分泌されたコリシン量に対応している。図25に示される結果は、多数の株を示している。colE3-CA38プラスミドを含んでいない株の回りには、ハローは絶対に観察されない。誘導剤（induction）の不存在下では、コリシンはサルモネラ株によって産生される。また、種々のタイプの誘導剤（すなわち、アルキル化剤、紫外線、X線）によって、全てのハローは用量依存的にその大きさを増すという証拠がある。

(77)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【0326】

15. 1. 3. 選択的E3クローンのオーバーレイアッセイ

形質転換体を種々の希釈濃度（1:10, 000まで）でLB上にプレーティングし、37℃で2時間増殖させる。次いで、感受性試験株をハローアッセイで上記の様に調製し、軟寒天によってオーバーレイを注ぐ。10分間固化させた後、次いで、プレートを逆さまにし、37℃で一晩インキュベートする。次いで、次の日に、透明領域の中央に小さなコロニー（又はコロニー群）を伴って、（バクテリオファージのブランクに似た）小さな透明領域が現れる。

【0327】

15. 1. 4. 「ブランク」又はハロー精製アッセイ

次に、上記のオーバーレイ寒天の透明領域の中心の小さなコロニーを、滅菌したパスツールピペットを用いて単離する。目に見えるコロニーが無いが、又は1つのハロー中に複数のコロニー群が有る場合のいずれかの場合には、ハロー全体を滅菌したパスツールピペットで吸い取る。コロニー又はハローを500 μ lのLB中に移す。希釈（1:10, 000まで）を行い、LB寒天上に戻し、37℃で2時間増殖させる。次いで、オーバーレイを上述した感受性試験株に注ぐ。次の日、コロニー群の全部又は殆どが、それらの回りにハローを有するはずである。

【0328】

16. 実施例：E3の*in vivo*注射、及びサルモネラ中のプラスミド保持率（%）の測定

下記実施例によって、*in vivo*でのサルモネラ中の*colE3-CA38*プラスミドの保持を証明する。

【0329】

41. 2. 9（又は41. 2. 9 E3-CA38）のいずれかの注射の30日後の2匹のマウス由来の腫瘍及び肝臓のホモジェネートを、この研究に用いた。下記の記載中において、L=肝臓、T=腫瘍である。4つ全てのホモジェネートをCFUのためにプレーティングし、コロニー群を*msbB* PCRによる分析及びコリシン産生のためにかきとった。41. 2. 9に類似するコロニーのほぼ純粋な培養物を全てのホモジェネートから得た。それぞれから、5つのコロニーを、コリシン及びPCR分析のためにかきとった。さらに41. 2. 9 E3肝臓ホモジェネート中のコリシン産生体（*producers*）及び非産生体の混合集団であるように見える30個のコロニーを、さらなる分析のために、41. 2. 9 E3 T及びLプレートからかきとった。これらの結果に基づいて、41. 2. 9 E3腫瘍及び肝臓由来のさらに100個のコロニーをかき取り、コリシン産生及び*msbB* PCRについて試験した。分布及びプラスミド保持率を組み合わせた日付（*combined date*）から算出した。

【0330】

*in vivo*でのE3注射、サルモネラ中のプラスミドの保持率（%）の測定の結果を下記表3に示す。

【0331】

【表3】

組織	CFU/ml	組織重量	CFU/gm	コリシン陽性数	<i>msbB</i> PCRでの陽性率（%）	プラスミド保持率（%）
41. 29L	1.07E+03	1.33	4.02E+03	0/5	100%	n/a
41. 29T	1.26E+07	0.26	2.42E+03	0/5	100%	n/a
41. 29E3L	1.15E+04	2.34	2.46E+04	87/135	100%	64.44
41. 29E3T	1.09E+06	0.35	1.56E+07	134/135	100%	99.26

【0332】

(78)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

colE3プラスミドが*in vivo*で効果を有するようにするため、及びそれが*in vivo*で腫瘍部位に他の遺伝子を運搬するために、colE3プラスミドは、*in vivo*で効力を有するように保持されていなければならない。エフェクターの標的は腫瘍であるので、この実験で得られた結果は、驚くべきことであり、また利点を有し、従って、肝臓それ自体への影響は少ないであろう。

【0333】

17. 実施例：M27肺腫瘍モデルでの種々の41.2.9株の腫瘍標的化

下記実験によって、41.2.9 colE3及び41.2.9 colE3 BRP及び41.2.9 colE3 BRP-m (改変BRP) サルモネラ株の腫瘍を標的とする能力を証明する。

10

【0334】

下記表4に列挙されたサルモネラ株をM27肺腫瘍を有する動物に注射し、動物を7日目に犠牲にした。臓器重量を、cfu/gの算出のために、次の日にアッセイした。腫瘍及び肝臓をホモジェネートし、msbB上に置き、コロニー形成単位(c.f.u.)を測定した。グループ1、2、4、及び6では、全ての株が、肝臓では $6 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ cfu/gの範囲で種々の蓄積量を伴って、腫瘍中では約 4×10^5 cfu/gまで蓄積された。表4は、全てのグループのデータをまとめたものであり、平均cfu/gで示されている。全ての株が良好な腫瘍蓄積量(10^5 c.f.u./グラム組織より良好)を有することが見出され、全ての株が正の腫瘍対肝臓比を与えた。BRP colE3は、最良の比を有するが、他の全ての利用可能な株よりも必ずしも良好ではなかった。E3及びE3 BRP株は、腫瘍対肝臓比が100~200:1の間で腫瘍において相当に高い濃度まで蓄積する。

20

【0335】

【表4】

グループ	株	腫瘍 (T) 肝臓 (L)	cfu/g 組織	比 (腫瘍:肝臓)
1	41.2.9/E3	T	$5.1 \pm 1.1 \times 10^5$	131:1
1	41.2.9/E3	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^5$	
2	41.2.9/E3 BRP	T	$4.6 \pm 2.7 \times 10^4$	209:1
2	41.2.9/E3 BRP	L	$2.2 \pm 1.3 \times 10^5$	
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	T	$3.5 \pm 0.15 \times 10^5$	90:1
6 ¹	41.2.9/E3BRP _m	L	$3.9 \pm 3.6 \times 10^5$	

30

¹: BRP_mとは、96位(GからAへの変異であり、グリシンからアルギニンへのアミノ酸変化をもたらす)及び114位(TからAへの変異であり、セリンからスレオニンへのアミノ酸変化をもたらす)での点突然変異を含む改変BRPをいう。突然変異体BRP_mは、もはや同様の溶解(quasi lysis)を起こさないが、まだ細菌からのタンパク質分泌能を有する(van der Wal, F., Koningstein, G., Ten Hagen, C.M., Oudega, B.及びLuirink, J. (1998)、大腸菌によるバクテリオシン放出タンパク質(BRP)仲介タンパク質放出の最適化: タンパク質放出から致死率及び同様の溶解を切り離すためのpClodF13誘導性BRP遺伝子の無作為突然変異(Optimization of Bacteriocin Release Protein (BRP)-Mediated Protein Release by Escherichia coli: Random Mutagenesis of pClodF13-Derived BRP Gene to Uncouple Lethality and Quasi-Lysis from Protein Release), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64, pp. 392-398)。

40

【0336】

50

(79)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

18. 実施例：C38ネズミ大腸癌への41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、C38ネズミ大腸癌の増殖を阻害する41.2.9/ColE3の能力を証明する。

【0337】

大腸38腫瘍断片 ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) を、C57BL/6マウス (雌、9週令) の皮下に埋め込んだ。腫瘍の体積が $1,000 \text{ mm}^3$ に達した後、滅菌条件下でマウスから腫瘍を除去し、小さな断片 (約 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ /断片) に切断し、上記操作を5回繰り返した。腫瘍埋め込みの0日目に腫瘍埋め込み針 (tumor implantation needle) を用いて、断片をマウスの右脇腹の皮下に埋め込んだ。

【0338】

腫瘍体積が $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、動物をサルモネラ投与の0日目に無作為化した。凍結保存されていた41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度 $7.5 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$ とした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート ($1.5 \times 10^5 \text{ CFU/マウス}$) を、0日目に記載のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を $1 \times 10^3 \text{ CFU}$ まで希釈し、msbBプレート上にプレーティングし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。実験の終わりまで、週2回腫瘍を測定した。各グループ (ColE3) の3つの腫瘍を解剖し、cfu及びプラスミドの保持率を測定するために処理した。

【0339】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	8
2.	41.2.9 (1.5×10^5 /マウス)	8
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10^5 /マウス)	8

【0340】

41.2.9/ColE3のC38ネズミ大腸癌への効力の結果を図26に示す。このデータは、VNP20009 (41.2.9) の静脈内注射によって処置されたマウスがC38ネズミ大腸癌の増殖を有意に阻害することができることを証明している。さらに、マウスをColE3プラスミドを含有するVNP20009で処置すると、腫瘍退化 (すなわち、腫瘍が、実験の初めよりも実験の終わりの方が小さい) が達成された。

【0341】19. 実施例：ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対するVNP20009/ColE3の抗腫瘍活性

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9に対するDLD1ヒト大腸癌の増殖を阻害する、サルモネラ突然変異体VNP20009/ColE3 (41.2.9/ColE3) の増大した能力を証明する。

【0342】

対数増殖期に増殖したDLD1細胞をトリプシン処理によって除去し、PBSで洗浄し、 5×10^7 細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液 (0.1ml) をヌードマウス (Nu/Nu-CD1雌、9週令; Charles River社より) の右脇腹に、0日目に単回皮下注射した (5×10^5 細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍サイズが $300 \sim 400 \text{ mm}^3$ に達する、腫瘍埋め込みの約10~15日後に無作為化し、供試した (staged)。サルモネラ突然変異体41.2.9及び41.2.9/ColE3のCFUを1日前に計数した。細菌 (41.2.9及び41.2.9/ColE3) を $1 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ に希釈した。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート ($2 \times 10^5 \text{ CFU/マウス}$) を、所定の日にマウスに皮下注射した。細菌懸濁液を $1 \times 10^3 \text{ CFU}$ に希釈し、各溶液 $100 \mu\text{l}$ をmsbBプレート上にプレーティングし、このプレートを一晩インキュベートした。次の日に細菌コロニーを計数した。腫瘍は、週2

(80)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

回測定した。

【0343】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール (PBS)	10
2.	41.2.9 (2×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (2×10^6 /マウス)	10

ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対する41.2.9/ColE3の抗腫瘍活性の結果を図27に示す。コリシンE3含有41.2.9株は、41.2.9株単独に比べて増大した活性を示す。

【0344】

20. 実施例：C57BL/6マウスのB16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9/ColE3の、B16-F10黒色腫の増殖を阻害する能力を証明する。

【0345】

対数増殖期で増殖するB16-F10細胞を、トリブリン処理によって除去し、PBSで洗浄し、 5×10^6 細胞/ml PBSに再構成した。細胞懸濁液 (0.1ml) をC57BL/6マウス (雌、9週令) の右脇腹に0日目に単回皮下注射した (5×10^5 細胞/マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍体積が150~200mm³に達する9日目に無作為化した。凍結保存されていたサルモネラクローン41.2.9及び41.2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度 7.5×10^8 cfu/mlとした。0.2mlの細菌懸濁液のアリコート (1.5×10^8 CFU/マウス) を、9日目に所定のグループのマウスに静脈内投与した。細菌懸濁液を 1×10^8 CFUに希釈し、msbBプレート上にプレーティングし、一晚インキュベートして、投与された細菌cfuの数を測定した。腫瘍は、実験の終わりまで週2回測定した。

【0346】

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	10
2.	41.2.9 (1.5×10^6 /マウス)	10
3.	41.2.9/ColE3 (1.5×10^6 /マウス)	10

C57BL/6マウス中のB16ネズミ黒色腫に対する41.2.9/ColE3の効力の結果を図28に示す。データは、41.2.9 (41.2.9) による静脈内注射によって処置されたマウスが、B16ネズミ黒色腫の増殖を有意に阻害できることを証明している。さらに、41.2.9/ColE3によって処置されたマウスは、41.2.9 単独に比べて早い時点 (最高37日まで) に腫瘍サイズの有意な減少を示した。より小さい腫瘍サイズは、より容易に他の治療剤 (例えば、化学療法剤及びX線などの照射) の影響を受け易いので、この知見は非常に重要である。

【0347】

21. 実施例：BRPと組み合わせた41.2.9/E3の抗腫瘍効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現が突然変異体の抗腫瘍効力を増加させることを証明する。

【0348】

サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現は、*in vitro* で細菌から分泌されるE3の量を増加させる。BRPが*in vivo* でサルモネラから

(81)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

分泌されるE3の量を増加させうる場合には、この追加的な細胞外E3が腫瘍細胞に容易に利用可能であり、従ってこれらの細胞に対する細胞毒性を増加させるという仮説を立てることができるであろう。この実験では、4つの動物グループ（グループ当たり10匹の動物）を試験した：

グループ番号	処置
1	コントロール（未処置）
2	41.2.9
3	41.2.9/E3
4	41.2.9/E3/BRP

10

この実験で用いたモデルは、ヒト肺癌系統HTB177とした。細胞を1日目にマウスの脇腹の皮下に埋め込んだ。腫瘍がおおよそ500mm³に達した14日目に、動物に上記表に記載の株の1×10⁶cfu、又はグループ1の場合には生理食塩水を静脈内注射により注射した。腫瘍体積は、24日目まで毎週測定した。表5の結果は、41.2.9が単独で腫瘍増殖を阻害でき（40%阻害）、一方、E3との組み合わせは抗腫瘍効力を増大させる（63%）ことができることを示している。しかしながら、E3及びBRPの両者を有する株をこのモデルで用いた場合、抗腫瘍効力はさらに増大し（未処置コントロールに比べて67%阻害）、増大した阻害率は、より早い時点で非常に有意である（表5）。

20

【0349】

【表5】

表5：未処置コントロールと比較した腫瘍増殖阻害率（%）

株	17日目	20日目	24日目
41.2.9	50	38	40
41.2.9/E3	63	58	63
41.2.9/E3/BRP	97	82	67

【0350】

30

結論として、細胞毒性コリシンE3及び機能強化された（enhanced）分泌系BRPの両者を有するサルモネラによる処置によって、未処置コントロール及び41.2.9/E3単独での処置に比べて抗腫瘍効力が増加する。

【0351】

2.2. 実施例：コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組合せ

下記実施例によって、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明する。

【0352】

スケジュールは次の通りである：0日目に、100匹のC57B6雌マウス（5～7週令）の身体を中心（mid body）の右側の皮下にB16F10黒色腫（5×10⁵細胞/マウス）を投与することによって腫瘍を埋め込んだ。8日目に、コリシンE3含有サルモネラ41.2.9を注射し、12日目及び26日目に、X線を照射した。

【0353】

コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組み合わせの結果を表6に示す。

【0354】

【表6】

(82)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

カテゴリー	n()	lgに対する日	平均	T/C
A sham 15Gy	(6)	12, 12, 18, 18, 18, 21	17	1.0
J 15Gy X線 12dpt, 26dpt	(9)	14, 14, 18, 21, 25, 35, 35, 67, 67	33	1.9
K 41.2.9+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 #1, 2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 60, 60, 67	47	2.8
L 41.2.9/E3+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 d32	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74, 78	57	3.3

10

【0355】

このデータは、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明している。E3は、41.2.9+X線で見られるよりもマウスの生存期間をさらに延長させた。

【0356】

2.3. 実施例：腫瘍標的細菌による細胞傷害性壊死因子の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌による大腸菌細胞傷害性壊死因子1 (CNF1) の発現を証明する。

20

【0357】

細胞傷害性壊死因子としては、以下に限定されないが、大腸菌細胞傷害性壊死因子1 (CNF1; Falboら, 1993, Infect. Immun. 61:4904-4914)、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) CNF1 (Linら, 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 250:462-465) 及び大腸菌細胞傷害性壊死因子2 (CNF2; Sugaiら, 1999, Infect. Immun. 67:6550-6557) が挙げられる。また、CNFファミリーとしては、CNF2のN末端部分と、27%の同一の残基及び80%の保存された残基を有するパステレラ・ムルチオシダ (*Pasteurella multocida*) 毒素 (PMT) (Oswaldら, 1994, Proc. Acad. Sci. USA 91:3814-3818) も挙げられる。

【0358】

CNF1は、大腸菌196 (ATCC 700336) から、標準的なPCRを用いて、プライマー、(フォワード) 5'-GTGTCATGAAAATGGGTAACCAATGGCAAC-3' (配列番号35) 及び(リバース) 5'-CACAGAGCTCGCGCTAACAAAACAGCACAAAGGGAG-3' (配列番号36) を用いたPCRによってクローニングした。約3100bpの産物が得られ、タンパク質の発現並びにDNAクローニング宿主として大腸菌を用いるDNAシーケンシングのためにpTre99aのNcoI及びSacI部位中にクローニングした。DNAシーケンシングは、ユール大学ケックバイオテクノロジー研究室 (Yale University Keck Biotechnology laboratory) の標準的な方法によって行った。DNAシーケンシングによって、クローン化PCR産物が、3065塩基対のうちの6つのほんの小さな配列変異を有するCNF1であることを確認した。

40

【0359】

CNF1プラスミドを、大腸菌DNAクローニング宿主DH5α及びサルモネラYS1646株 (国際公開第WO99/13053号) 中に電気穿孔した。標準的なLDHアッセイ (Promega社製、マディソン、ウィスコンシン州、Cytotox 96 (登録商標)) を用いて、大腸菌DNAクローニング宿主及びサルモネラYS1649株におけるCNF1の発現を測定した。図29は、CNF含有プラスミドの存在が細胞毒性の増大をもたらすことを示している。続くアッセイを用いて、CNF含有プラスミドを有するサ

50

(83)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

ルモネラが多核化 (multinucleation) (Ryckeb, 1990, J. Clin. Microbiol. 28:694-699) などのCNF1の他の既知の特性をも示すことを示した。CNF1に暴露したHela細胞の核を、光学顕微鏡法によって試験した。図30の結果は、サルモネラ中にCNF1が存在することによって期待される多核化及び細胞肥大 (cell enlargement) がもたらされることを明瞭に示している。

【0360】

2.4. 実施例：腫瘍標的細菌によるペロ毒素の発現

下記実施例によって、ペロ毒素ABを発現するように遺伝子操作された腫瘍標的細菌によって産生されるペロ毒素ABの細胞毒性を証明する。

10

【0361】

ペロ毒素 (合成 (syn.) HSC10毒素、シガ (Shiga) 毒素、シガ様毒素、シゲラ (Shigella) 毒素)。この毒素は、コリシン産生大腸菌HSC10株から単離されたものであり、元々はコリシンであると考えられていた (Farkas-Himsleyら, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92(15): 6996-7000)。それは抗腫瘍活性、特に卵巣癌及び脳腫瘍に対する抗腫瘍活性の長い歴史を有しているが、この抗腫瘍活性は、生きている細菌全体ではなく、精製された調製物と関係している。

【0362】

ペロ毒素を、ペロ毒素Iの公開されている配列に基づくプライマーを用いて大腸菌HSC10 (ATCC 55227) からクローニングし、標準的なDNAシーケンシング法を用いて、ユール・ケック・バイオテクノロジー・センター (Yale Keck Biotechnology Center) でのDNAシーケンシングによって確認した。ペロ毒素の発現は、ペロ毒素A及びBサブユニットによる多シストロン性のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で、BRP遺伝子を用いて達成した。このテトラサイクリン誘導性BRPペロ毒素ABを、msbB遺伝子を用いる染色体組み込みのためのベクター中にクローニングした。

20

【0363】

2.4. 1. ベクターの構築

2.4. 1. 1. ABの増幅及びクローニング

30

ペロ毒素AB (AB) は、下記プライマーを用いるPCRによって生成した：

H19B-7：フォワード：5'-GTGTCCATGGCTAAAACATTATTA
ATAGCTGCATCGC-3' (配列番号37)；及び
QSTX-R1：リバーズ：5'-GTGTCTGCAGAACTGACTGAATTG
AGATG-3' (配列番号38)。

【0364】

また、これらのプライマーは、ptrc99AのNcoI及びPstI部位中にクローニングするための外側のNcoI (5') 及びPstI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

【0365】

40

2.4. 1. 2. TetBRPの増幅及びクローニング

TetBRP-ABを、中間体ベクターpSP72-F6/R6中に構築した。TetBRPは、次のプライマーを用いてPCRによって生成した：Tet-5'：フォワード5'-GTGTAGATCTTTAAGACCCACTTTTCACATTTAAGTTG-3' (配列番号39) 及びBRP-TET-3'：リバーズ5'-CACAGGATCCTTACTGAACCGCGATCCCCG-3' (配列番号40)。これらのプライマーは、pSP72-F6/R6ベクターのBglII及びBamHI部位中にクローニングするためのBglII (5') 及びBamHI (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

【0366】

50

24. 1. 3. pSP72-F6/R6-TetBRP中へのABのサブクローニング
 ptre99A-ABを、pSP72F6/R6-TetBRP中に挿入するためにBamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化してABを除去し、また、BamHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化した。pSP72F6/R6ベクターは、トランスで(*in trans*) lacZ- α 相補性のための β -gal遺伝子の部分の他に、クローニングのための複数の制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。ベクター(pSP72F6/R6-TetBRP)及びABインサートの両者は、0.8%1XTAEアガロースゲル上で分離し、キアーゲン(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。T4リガーゼを用いて、ベクター及びインサートを連結し、熱ショック法を用いてDH5a大腸菌細胞中に形質転換した。この細胞を、100 μ g/mlのAmp及び40 μ g/mlのX-galを含有するLBプレートにプレーティングした。アンピシリン耐性及び機能性 β -gal遺伝子の存在に基づいて陽性コロニーを選択した(陽性コロニーは青色だった)。

[0367]

24. 1. 4. pCDV442中へのTetBRP-ABのサブクローニング
 pSP72F6/R6-TetBRP-ABを、pCVD442ベクター中にサブクローニングするためにNotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化し、また、NotI及びSfiI制限エンドヌクレアーゼで消化した。

[0368]

24. 1. 5. msbB染色体ベクター

VNP20009株の染色体中のDmsbB遺伝子との相同組み換えを行うことができるベクター(国際公開第WO99/13053号中のa. k. a. YS1646)を、自殺ベクターpCVD442(Donnenberg及びKaper, 1991, *Infection and Immunity* 59: 4310-4317)中に構築した。2つの別の産物としてVNP20009中に存在するmsbB欠損の5'及び3'側切片の部分を生産する、PCR用のプライマーを設計した(msbB-5':フォワード5'-GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG CCG TTA ACC C TC TGA C-3' (配列番号41)及びリバーズ5'-GTG TGC ATG CG G GGG GCC ATA TAG GCC GGG GAT TTA AAT GCA AAC GTC CGC CGA AAC GCC GAC GCA C-3' (配列番号42):並びにmsbB-3':フォワード5'-GTG TGC ATG CGG GGT TAA TT A AGG GGG CGG CCG CGT GGT ATT GGT TGA ACC GAC GGT GCT CAT GAC ATC GC-3' (配列番号43)及びリバーズ5'-GTG TCT CGA GGA TAT CAT TCT GGC CTC TGA CGT T GT G-3' (配列番号44))。また、これらのプライマーは、これらの2つの断片が共通のSphI部位を介して結合するときに、pCVD442のSacI及びSalI部位中へのクローニングを容易にするために、外側のSacI(5')及びAcaI(3')制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、抗生物質耐性を伴わない安定な染色体組み込みのためのDNA断片のDmsbB中へのクローニングを容易にするために、内部のNotI、PacI、SphI、SfiI、SwaI及びDraIを生成する(図31)。このベクターをpCVD442-msbBと呼ぶ(図32及び33を参照されたい)。

[0369]

Tet-BRP-ABをpCVD442-msbB中にクローニングするために、Tet-BRP-ABプラスミドDNAを制限消化し、適当なDNAを精製し、T4リガーゼを用いて、これら2つの構成要素を含む連結反応を行った。次いで、連結反応物をDH51pirに形質転換し、コロニーをTet-BRP-ABの存在及び配向でスクリーニングした。Tet-BRP-ABクローンをSM101pir株(前記Donnenberg及びKaper, 1991)中に形質転換し、そのプラスミドをpCVD442-Tet-BRP-ABと称した。SM101pirのコロニーを、PCRによるTet-BRP-AB遺伝子についてスクリーニングし、サルモネラ株に対する交配ドナー(m

(85)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

ating donor)として用いるために、SM10 1 pirクロンpCVD442-Tet-BRP-ABを選択した。pCVD442-Tet-BRP-ABを含有するSM10 1 pirを、標準的な方法(Davis, R. W., Botstein, D., 及びRoth, J. R., 1980, 最新細菌遺伝学(Advanced Bacterial Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)によって、サルモネラYS50101株(Difco MacConkey寒天に対する増強された耐性を有するテトラサイクリン耐性YS82株(前記Lowら, 1999)の自然発生誘導体)と交配し、50 µg/mLのカルベニシリン(carb)及び300 µg/mLのストレプトマイシン(strep)を含むプレート上で選択した。得られたYS50102-pCVD442-Tet-BRP-ABクロンを、PCRによりpCVD442-Tet-BRP-AB遺伝子についてチェックした。

【0370】

24. 2. 41. 2. 9-Tet-BRP-AB株を生産するために染色体に組み込まれたpCVD442-Tet-BRP-ABの41. 2. 9(YS1646)中への送込ドナーとしてYS50102-Tet-BRP-AB株を用い、バクテリオファージP22(突然変異体HT105/1 int-201; Davisら, 1980)によって、カルベニシリン耐性を41. 2. 9に形質導入した。pCVD442由来のbla及びsacB遺伝子の存在によって、DmsbB及びDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子の両者を含む41. 2. 9-pCVD-Tet-BRP-AB-1を表すcarb^r(又はamp^r)suc⁺株の選択が可能になる(図33、#3)。41. 2. 9-Tet-BRP-AB-1株をLBスクロース上にプレーティングし、suc⁺carb⁺誘導体を選択し、DmsbB遺伝子を除去し、LB-スクロース寒天プレートを、NaCl無しで作製する以外は、前記Donnenberg及びKaper, 1991(図33、#4)の方法に従ってDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子を残し、プレートを30℃でインキュベートした。これらのプレート上でコロニーが増殖した後、それらをmsbBプレートにグリッドを据え(gridde)、抗生物質及びスクロースマーカーの両方を欠損したクロンの存在を検出するために、複製をカルベニシリン又はスクロースのいずれかを含有するプレートにプレーティングした。得られたクロンを、PCRによりTet-BRP-AB遺伝子の存在についてチェックした。染色体に組み込まれたTet-BRP-ABを含有し、スクロース感受性及びカルベニシリン耐性を欠損している1つの誘導体を、41. 2. 9-Tet-BRP-ベロ毒素ABと表示した。

【0371】

標準的なLDH細胞毒性アッセイ(Cytotox[®] (登録商標); Promega社製、マディソン、ウイスコンシン州)を用いてin vitroで41. 2. 9-Tet-BRP-ベロ毒素ABの細胞毒性を試験した。結果を図34に示す。この結果は、ベロ毒素発現クロン26及び31の毒性特性を証明している。クロン26及び31は、テトラサイクリンで処理しなかったときよりもテトラサイクリンで処理したときの方が有意に高い細胞毒性率(%)を有していた。

【0372】

25. 実施例：腫瘍標的細菌による溶血素の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌を遺伝子操作して溶血素などの溶血性タンパク質を、構成的に又は誘導性制御下で発現できることを証明する。

【0373】

溶血素は、赤血球細胞を溶解させる能力を有する、周知の細胞毒性タンパク質である(例えば、Beutin, 1991, Med. Microbiol. Immunol. 180:167-182)を参照されたい)。SheA(Genbank番号EC0238954)は、殆どが野生型大腸菌で見出される、通常は発現されないサイレントな溶血素である(Fernandezら, 1998, FEMS Microbiol Lett. 168:85-90)。SheA(a. k. a. hlyE; Genbank番号U5

(86)

JP 2004-500042 A 2004.1.18

7430) は、野生型大腸菌 (2507株、ユール大学大腸菌遺伝子保存センター (Yale University E. coli Genetic Stock Center) から、下記プライマー (フォワード) 5'-TTTTTTTCCAT GGCTATTA TG ACTGAAATCG TTGCAGATAA AACGG-3' (配列番号45) 及び (リバース) 5'-TTTTTTTAAGC TTCCCGGGTC AGACTTCA GG TACCTCAAAG AGTGTC-3' (配列番号46) を用いたPCRによって、標準的なPCR条件下でクローニングした。正しいサイズのPCR産物を、部分的に構成性の *trc* プロモーター下に置くために、*ptrc99a* (Pharmacia社製) の *Nco*I 及び *Hind*III 部位中にクローニングした。また、PCR産物を *Nco*I 及び *Eco*RV によって切断した *tet-bgal-Z-term* バクター (前記) 中にクローニングした。次いで、大腸菌 DH5a (Gibco社製) を、そのプラスミドで形質転換し、0.2 μ g/ml のテトラサイクリンを添加した及び添加しない血液寒天培地 (5% ヒツジ血液を有するトリプシン性ダイズ寒天培地; BioMerieux社製、ロンバード、イリノイ州) にプレーティングした。溶血を示すコロニーの周りの透明なハローを含むコロニーを陽性コロニーとして取り上げた。陽性コロニーを標準的なプラスミド精製に付し、サルモネラ YS501 に形質転換し、再度ハローについてスクリーニングした。

【0374】

構成性のハロー形成を、テトラサイクリンの添加によって又は添加無しにハローが観察される、*trc99a* 構築物について図35 (2A及び2B) に示す。テトラサイクリン依存性ハロー形成を、テトラサイクリンの添加を伴わずにハローが観察されない、テトラサイクリンプロモーター誘導性 *SheA* について図35 (3A及び3B) に示す。これらの結果は、腫瘍標的細菌が、構成的に又は誘導性制御下で、溶血性タンパク質を発現できることを証明している。

【0375】

2.6. 実施例：腫瘍標的細菌によるメチオナーゼの発現

下記実施例によって、サルモネラなどの弱毒性腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、メチオナーゼを発現させることができることを証明する。

【0376】

メチオナーゼは、腫瘍増殖に必要な必須アミノ酸であるメチオニンを分解する酵素である。腫瘍増殖を阻害するための又はメチオナーゼをコードするDNA若しくはウイルスベクターを投与するための精製メチオナーゼの投与に関しては報告されている (Xu及びTanによる国際公開第WO00/29589号)。Xu及びTanは、メチオナーゼの送達のための腫瘍特異的細菌ベクターの使用法を開示しておらず、精製タンパク質によって効力を達成するためには、大量のメチオナーゼが必要である。メチオナーゼを直接腫瘍に送達する新規な方法は、腫瘍標的細菌を用いて酵素を発現させる。

【0377】

Genbank 番号 L43133 に基づくニュードマス・プティダ (*Pseudomonas putida*) から、下記プライマーを、メチオナーゼ用に生成した：

フォワード：METH-XHOI

5'-CCGCTCGAGATGCACGGCTCCAACAAGCTCCCA-3' (配列番号47)；及び

リバース：METH-BAM

5'-CGCGGATCCTTAGGCACTCGCCTTGAGTGCCCTG-3' (配列番号48)

上記列挙したプライマー (4mM) 及び鋳型として、ニュードマス・プティダの単離されたコロニーを用いて、メチオナーゼの配列を下記条件下でのPCRによって増幅した：

94℃、5分間を1サイクル、次いで94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃で2分間を35サイクル。72℃、10分間の最終増幅工程は、PCR反応の最後の工程として行った。PCR産物を0.8% TAE アガロースゲル上で分離し、メチオナー

(87)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

ぜの予想されるサイズ (約1196 bp) からなるPCR産物を同定した。バンドを、ゲルから切り取り、キアーゲンゲル抽出キットを用いて精製した。

【0378】

pSP72ベクター及び上記で得られた単離したゲル精製メチオナーゼ遺伝子の両者を制限酵素Xho I及びBam HIで消化した。消化したベクター及びメチオナーゼを、0.8%1XTAEアガロースゲル上で分離した。線状化ベクターに対応する消化生成物及び消化されたメチオナーゼ遺伝子をゲルから切り取り、キアーゲンゲル抽出キットを用いて精製した。線状化ベクター及びインサート (メチオナーゼ) をT4リガーゼを用いて一緒に連結した。連結混合物を、熱ショック法によってDh5a大腸菌細胞中に形質転換した。細胞を、回収した後、100mg/mLのアンプシリン (Amp) を含有するLB培地にプレーティングして、完全なpSP72ベクターを含有する細胞を選択した。Amp耐性コロニーを同定し、キアーゲンミニプレップキット (Qiagen mini-prep kit) を用いたプラスミド調製並びに酵素Eco RI及びBsp HIによる制限消化によって、メチオナーゼ遺伝子を含有するpSP72ベクターの存在を確認した。クローン#9を、配列決定のために、エール大学医学部 (Yale University School of Medicine) のエール・シーケンシング・ファシリティ (Yale sequencing Facility) に送った。SP6 (フォワード) 及びT7 (リバース) シーケンシング・プライマーの両者を用いて配列決定がなされた。結果は、配列が、PCRによってTAAに変わっているTGA停止コドンを除いて、公表されているメチオナーゼの配列と100%一致することを証明している。

【0379】

メチオナーゼ活性は、Horiら, 1996, Cancer Research 56: 2116-2122に記載のメチオナーゼアッセイを用いて測定できる。

【0380】

27. 実施例：弱毒化腫瘍標的細菌でのTAT融合物としてのアポチン (apoptin) タンパク質の発現

下記実施例によって、弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、エフェクター分子、並びにTAT、アンテナペディア (antennapedia)、VP22、及びカポジ (Kaposi) FGF MTSなどのフェリー・ペプチド (ferry peptide) を含む融合タンパク質を発現させ分泌させることができることを証明する。

【0381】

27. 1. TAT-アポチンベクターの構築

カナリア・ウイルス (CAV) タンパク質であるアポチンは、アデノウイルスベクターによって送達されたときに、新生物細胞中でアポトーシスを誘導することが知られている (例えば、Notebornら, 1999, Gene Therapy 6: 882-892を参照されたい)。

【0382】

サルモネラの細胞質中で転写されるが、腫瘍細胞の核に輸送され、アポトーシスを引き起こす能力を有するタンパク質を生産するために、アポチンタンパク質をヒト免疫不全症ウイルス (HIV) TATタンパク質から誘導されるペプチドに融合した (例えば、Schwartzら, 1999, Science 285: 1569-2572を参照されたい)。TATタンパク質融合物は、正電荷を増加させ、タンパク質精製を容易にもするポリヒスチジン (ヘキサヒスチジン) アミノ酸と融合した場合に、機能性であることも示されているので (前記Schwartzら, 1999)、TAT-アポチン融合物を、ヘキサヒスチジンによって及びそれ無しで生産した (図36A及びB)。さらに、TAT-アポチン融合物は、OmpA-8Lシグナル配列によって及びそれ無しに生産できる (図36A及びC)。

【0383】

アポチン及びヘキサヒスチジン・アポチンは、オーバーラップ・オリゴヌクレオチドを用いて構築される。アポチンをコードする核酸配列は、下記オリゴヌクレオチドを用いるF

(88)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

CRによって生成した：

TAP1: 5'-GATCCCATGG CTTATGCCAG AAAAAACGC CGTCAGCGCC
GTCGCATGAA CGCGCTGCAG GAAGATACCC CGCCGGGCC GTCCACCGTG
TTTCGCCCGC CG-3' (配列番号 49)

TAP2: 5'-GGGACAGGGT GATGGTGATG CCCGCGATGC CGATGCGGAT
TTCCGCGCAA TGCGGGGTTT CCACCGGGCG GGAGGAGGTC GCGGGCGAA
ACACGCTGGA CGG-3' (配列番号 50)

19

TAP3: 5'-GGCATCGCGG GCATCACCAT CACCCTGTCC CTGTGCGGCT
GCGCGAAGCG CCGCGCGCC ACCCTGCGCT CCGCGACCGC GGATAACTCC
GAAAAACCCG GC-3' (配列番号 51)

TAP4: 5'-GCGATATTCG GACGGATCGC AGGAGCGTTT TTTGGACGGC
GGTTTCGGCT GATCGGTGCG CAGATCCGGG ACGTTTTTAA AGCCGGTGT
TTCGGAGTTA TCCGCGGTCC C-3' (配列番号 52)

20

TAP5: 5'-CCTGCGATCC GTCCGAATAT CGCGTCTCCG AACTGAAAGA
ATCCCTGATC ACCACCACCE CGTCCCGCCC GCGCACCGCC CGCCGCTGCA
TCCGCCTCTG AAAGCTTCAT G-3' (配列番号 53)

TAP6: 5'-CATGAAGCTT TCAGAGGCGG ATGCAGCGGC GGGCGGTGCG C-3'
(配列番号 54)

TAP 2-TAP 6オリゴヌクレオチド及びTAP 6 H1オリゴヌクレオチド

30

(5'-GATCCCATGG CTCATCACCA TCACCACCAT TATGGCCGCA
AAAAACGCCG TCAGCGCGT CGCATGAACG CGCTGCAGGA AGATACCCCG
CCGGGCC-3'; 配列番号 55)

を用いて、TAT-アポチン融合タンパク質のヘキサヒスチジン含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。TAP 6オリゴヌクレオチド及びomp 8 L F1オリゴヌクレオチド

(5'-GATCCCATGG CTA AAAAGAC GGCTCTGGCG CTTCTGCTCT
TGCTGTTAGC GCTGACTAGT GTAGCGCAGG CCTATGGCCG CAAAAACGC
CGTCAGCGCC-3'; 配列番号 56)

40

を用いてPCRにより、TAP 1-TAP 6オリゴヌクレオチドのPCR産物から、TAT-アポチン融合タンパク質のOmp A 8 L含有バージョンをコードする核酸配列を生成した。

【0384】

各オリゴヌクレオチドを、4 μ M濃度の保存溶液に調製した。予め混合されたPCR反応ビーズ (Pharmacia社製、Ready-to-go beads) を用い、各オリゴヌクレオチドの2 μ lを使用した。PCR反応は、95℃で5分間を1サイクル；95℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間を35サイクル；及び72℃で10分間を1サイクルから構成されていた。次いで、PCR産物を、フェノール/クロロホルムで

50

(89)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

抽出し、エタノールで沈殿させ、水中に再び溶解し、Nco I及びHind IIIによる制限消化に付した。制限消化されたPCR産物を、ゲル電気泳動によって分離し、正しいサイズの産物（TAT-アポチン及びヘキサヒスチジン-TAT-アポチンに対して、それぞれ約420及び450bp）をゲルから切り取り、標準的な分子生物学的方法を用いて単離した。これらの産物をNco I及びHind III消化されたptrc99a（Pharmacia社製）中に連結し、ptrc99a-TAT-アポチン構築物を得た。TAT-アポチン（図37）及びヘキサヒスチジンTAT-アポチン（図38）の両者の正しいDNA配列を得た。

【0385】

27. 2. TAT-アポチンの分泌及び取り込みの証明

10

弱毒化腫瘍標的細菌を、当業界で公知の標準的な方法によって（例えば、熱ショック又は電気穿孔によって）ptrc99a-TAT-アポチン構築物によって形質転換し、培地中で培養する。当業者に公知の方法（例えば、ウエスタンブロット分析又はELISA）を用いて、TAT-アポチンの存在について、細菌培養物からの上清を試験する。一旦、細菌培養物の上清中のTAT-アポチンの存在が確認されたなら、細菌培養上清を哺乳動物細胞（例えば、NIH3T3、CHO、293、及び293T細胞）と共にインキュベートし、細胞内部のTAT-アポチンの存在を、当業者に公知のアポチンアッセイによって確認する。

【0386】

27. 3. 腫瘍内へのTAT-アポチンの取り込みの証明

20

TAT-アポチン又はアポチンを発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を、B16腫瘍モデルに静脈内投与する。マウスは、細菌の投与後数日で犠牲にし、臓器重量を測定する。当業者に公知のアポトーシスアッセイ（例えば、DNAラダーリング（DNA laddering）及びフルオレセイン *in situ* 細胞死検出キット（Boehringer Mannheim社製、マンハイム、ドイツ）を用いてTAT-アポチン又はアポチンの存在及び局在について腫瘍をアッセイする。さらに、腫瘍のサイズをアッセイし、TAT-アポチンの抗腫瘍活性を測定する。また、腫瘍をホモジェネートし、プレーティングして、コロニー形成単位（c. f. u.）を測定する。

【0387】

28. 実施例：マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009と化学療法剤との組合せの効力

30

下記実施例によって、化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍標的細菌の投与が、相乗的又は相加的に働いて、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを証明する。

【0388】

28. 1. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とサイトキサン（cytotoxin）又はVNP20009とマイトマイシンCとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27ネズミ肺癌細胞（ 1×10^6 / ml $\times 1$ ml）を、37℃で細胞を素早く解凍することによって正常な状態に戻し、37℃、5%CO₂で10%ウシ胎仔血清（FCS）を含有するDMEM培養培地10mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期にあるM27細胞をトリプシン処理によって取り出し、1×PBSで洗淨し、腫瘍埋め込みのために、1×PBSで 2.5×10^6 細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液を、0日目に、100匹のC57BL/6マウス（雌、8週令、20g； 5×10^5 細胞/マウス）の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが10匹のマウスからなるように、無作為に10のグループに分けた。

【0389】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって、1×PBSで 5×10^6 CFU/mlに希釈した。各マウスに、下記表6に従って12日目に、希釈したサルモネラ（ 1×10^6 CFU/マウス）0.2mlを静脈内投与した。注射した細菌の実数を測定するため、 5×10^6 CFU/mlの細菌懸濁液を、さらに 1×10^3 CFU/mlに希釈し、栄養寒天培地（MesbBプレート；国際公開第WO99/13053

50

(90)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

号) 上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0390】

マイトマイシンC (Sigma社製) 及びサイトキサン (Sigma社製) を、下記表7に従ってマウスに投与した。マイトマイシンCの2回目の用量を22日目に組み合わせグループには投与したが、腫瘍のサイズが大きいために、マイトマイシンC単独で処置されたグループには投与しなかった。VNP20009+サイトキサンで処置したグループで、重篤な中毒反応が観察されたので、シプロ (Cipro; Bayer Inc. 社製、ウエストハーベン、コネチカット州) 200mpkを、VNP20009単独又はVNP20009+化学療法剤で処置した各マウスに投与した。実験の終わりまで、腫瘍体積を週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室に保持した。床敷きを週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

【0391】

【表7】

グループ	マウス数
未処置コントロール	10
3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15日	10
150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 3 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 5 mpk マイトマイシンC、静脈内、15及び22日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 150 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10
VNP20009、 1×10^6 /マウス、静脈内、12日+ 200 mpk サイトキサン、腹腔内、15日	10

【0392】

図39に示すように、VNP20009+サイトキサンによる組み合わせ処理は、VNP20009処置単独又はサイトキサン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。図40に示すように、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、マイトマイシンC単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。しかしながら、VNP20009+マイトマイシンCの組み合わせは、VNP20009処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害しなかった (図40)。これらの結果は、化学療法剤と組み合わせた弱毒性腫瘍標的細菌の投与が、相乗的又は相加的に働き、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

【0393】

28. 2. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とシスプラチンとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27ネズミ肺癌細胞 (1×10^6 / ml \times 1 ml) を、37℃で素早く細胞を解凍することによって正常な状態に戻し、37℃、5%CO₂でウシ胎仔血清 (FCS) を含有するDMEM培養培地2.5mlで培養した。細胞を2世代継代させた後、対数増殖期 (約90~95%飽和) にあるM27細胞を、トリプシン処理によって取り出し、1×PBSで洗浄し、腫瘍埋め込みのために、1×PBSで 2.5×10^6 細胞/mlに再構成した。M27細胞懸濁液 (0.2ml) を、0日目に、36匹のC57BL

(91)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

／6マウス（雌、8週令、20g：5×10⁵細胞／マウス）の右脇腹の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが9匹のマウスからなるように、無作為にグループ分けした。

【0394】

サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって1×PBSで5×10⁵ CFU／mlに希釈した。下記表8に従って12日目にサルモネラ（1×10⁵ CFU／マウス）0.2mlを、各マウスに尾静脈経由で投与した。注射した細菌の実数を測定するために、5×10⁵ CFU／mlの細菌懸濁液を、1×10³ CFU／mlにさらに希釈し、MsBbプレート上にプレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。

【0395】

細菌注射の2日後の14日目に、マウスにシスプラチンを投与した（下記表8）。シスプラチンを、投与前に、正常生理食塩水で0.5mg／mlに希釈した。腫瘍体積は、実験の終わりまで週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室内に保持した。床敷きは週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

【0396】

【表8】

グループ	マウス数
コントロール（未処置）	9
VNP20009、1×10 ⁵ /マウス、静脈内、12日	9
5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19日	9
NP20009、1×10 ⁵ /マウス、静脈内、12日＋ 5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14、19、33日	9

【0397】

図41に示すように、VNP20009＋シスプラチンによる組み合わせ処置は、VNP20009処置単独又はシスプラチン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。これらの結果は、シスプラチンなどの化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍標的細菌の投与は、相乗的又は相加的に働き、肺癌などの固形腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

【0398】

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施態様によってその範囲を限定されるものではない。実際に、先行する記載及び添付の図面から、本明細書中に記載されているものの他に、本発明の多様な変形が存在することは、当業者には明らかであろう。そのような変形は、特許請求の範囲内に入ることを意図する。

【0399】

種々の刊行物が本明細書中で引用されており、それらの開示は、参照によってそれらの全体が本明細書中に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

成熟ヒトTNF-αのコード配列を示す図である。DNA配列（配列番号3）とタンパク質配列（配列番号4）の両方を示す。

【図2】

サルモネラVNP20009 ser C株の誘導を示す図である。

【図3】

ネズミチフス菌における、染色体に組み込まれたtreプロモーター駆動TNF-α遺伝子からのTNF-α発現を示す図である。

【図4】

成熟ヒトTNF-α（ヌクレオチド67-543）との合成OmpAシグナル配列（ヌク

(92)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

レオチド1-63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号7)とタンパク質配列(配列番号8)の両配列を示す。

【図5】

大腸菌(JM109株)におけるOmpA/TNF- α 融合タンパク質の周辺細胞質局在化およびプロセッシングを示す図である。

【図6】

成熟ヒトTRAIL(ヌクレオチド67-801)とのOmpAシグナル配列(ヌクレオチド1-63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号9)とタンパク質配列(配列番号10)の両配列を示す。

【図7】

大腸菌(JM109株)におけるOmpA TRAIL融合タンパク質の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図8】

成熟(C125A)ヒトIL-2(ヌクレオチド64-462)との修飾OmpAシグナル配列(ヌクレオチド1-63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号11)とタンパク質配列(配列番号12)の両配列を示す。

【図9】

phoA(8L)またはompA(8L)合成シグナルペプチドに融合した成熟ヒトIL-2の発現およびプロセッシングを示す図である。

【図10】

成熟(C125A)ヒトIL-2(ヌクレオチド64-462)との修飾phoAシグナル配列(ヌクレオチド1-63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列(配列番号13)とタンパク質配列(配列番号14)の両配列を示す。

【図11】

ヒトTNF- α の成熟形態を発現するネズミチフス菌弱毒化株の*in vivo*抗腫瘍効力を示す図である。

【図12】

BRP発現が*in vivo*抗腫瘍効力に及ぼす影響を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)VNP20009；および(3)BRP遺伝子を含むpSW1プラスミドを保有するVNP20009で治療した、B16黒色腫を有するC57BL/6マウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示したグラフである。

【図13】

サルモネラにおける、pepTプロモーターの制御下での β -gal遺伝子発現の嫌気性菌誘導を示す図である。図13Aは、2株のサルモネラ、YS1456およびVNP20009の嫌気性条件にตอบสนองする β -gal発現の*in vitro*誘導を示す図である。図13Bは、BRP、 β -gal、もしくはBRPと β -galを発現するVNP20009サルモネラの、腫瘍対肝細胞における β -galの*in vivo*誘導を示す図である。

【図14】

サルモネラにおける、Tetプロモーターの制御下での β -gal遺伝子発現のテトラサイクリン誘導を示す図である。用量応答は、約0.15 μ g/mlの濃度までテトラサイクリンに対し線形応答を示すが、これを超えると、応答の低下がみられ、これは恐らく、テトラサイクリンの抗生物質作用によるものと考えられる。

【図15】

pTrec99aベクターからのヘキサヒスチジン-エンドスタチン(ヘキサHIS-エンドスタチン)発現を示す図である。図15Aは、サルモネラ(VNP20009)に形質転換させた3つの独立したクローンからのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。図15Bは、大腸菌(DH5 α)に形質転換させた5つの独立したクローンからのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。偶数番号のレーンは、非誘導培養物からの抽出物を、また、奇数番号のレーンは、対応するIPTG誘導培養物からの抽

(93)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

出物をそれぞれ示す。

【図16】

プラスミドYA3334からのヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。asd系(treプロモーターを用いる)におけるヘキサHIS-エンドスタチンは、抗ヒスチジン抗体を用いたウェスタン分析によりヘキサHIS-エンドスタチン(～25kD)の適正サイズのパンドを発現することができる。

【図17】

C38マウス大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009細胞の効力を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)空のYA3334ベクターを保有するasd⁻VNP20009；(3)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンを発現するasd⁻VNP20009；および(4)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたC38腫瘍を有するマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

【図18】

DLD1ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009細胞の効力を示す図である。同図は、(1)PBS対照；(2)空のYA3334ベクターを保有するasd⁻VNP20009；および(3)ヘキサヒスチジン-エンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたDLD1腫瘍を有するヌードマウス集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示すグラフである。

【図19】

内皮細胞に対するヒトエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、bFGFおよび 8×10^8 細菌に相当する溶解物に応答するヒト静脈内皮細胞(HUVEC)増殖の阻害を示す。対照として、空のpTreベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

【図20】

内皮細胞に対する血小板第4因子ペプチド(血小板第4因子のアミノ酸47-70)およびトロンボスポンジンペプチド(13, 40)を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの溶解物の抗増殖活性を示す図である。同図は、bFGFおよび 8×10^8 細菌に相当する溶解物に応答するヒト静脈内皮細胞(HUVEC)増殖の阻害を示す。対照として、空のpTreベクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンプルを細菌数で基準化した。

【図21】

pE3. シャトル-1ベクターの構築を示す図である。

【図22】

ColE3-CA38ベクター(GenBank登録番号AF129270)の構築を示す図である。ColE3-CA38ベクターのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。ColE3-CA38ベクターは、配列番号2～5にそれぞれ示すように、5つのオープンリーディングフレームを含む。

【図23】

ColE3-CA38/BRP-1ベクターの構築を示す図である。

【図24】

各株によって産生されたコリシンE3の致死単位の量を示す棒グラフである。

【図25】

紫外線またはX線に暴露された各種菌株についてのハロー(halo)アッセイを示す図である。

【図26】

C38マウス大腸癌に対する41.2.9/ColE3の効力を示す図である。

【図27】

NU/NuマウスにおけるDLD1ヒト大腸癌に対する41.2.9/ColE3の抗

(94)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

腫瘍活性を示す図である。

【図28】

B16マウス黒色腫に対する41.2.9/Col E3の効力を示す図である。

【図29】

クローン化大腸菌CNF1を発現するサルモネラの細胞毒性を示す図である。

【図30】

CNFに暴露されたHeLa細胞(A)は、正常なHeLa細胞(B)と比べて、腫脹および多核形成を示す。

【図31】

3'から5'方向(図32のマップからわかるように)のpCVD442-msbBベクターのmsbB部分を示す図であり、該部分は、msbBの中央に欠失を有し、かつその箇所に内部NotI、PacI、SphI、SfiI、SwaIおよびDraIポリリンカーを含む(配列番号61)。図32参照。

【図32】

DmsbB領域にDNAをクローン化し、続いて染色体に挿入するためのpCVD442-msbBベクターの制限マップおよび概略図である。MsbBdelは、DmsbBの5'および3'領域であり；mobRP4は、プラスミドを1つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。blaは、カルベニシリンおよびアンピシリン等のβ-ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与するβ-ラクタマーゼである。SacBは、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。

【図33】

1) pCVD442-Tet-BRP-ABベクター、2) サルモネラYS50102におけるDmsbB染色体コピーによる相同的組換え、3) サルモネラYS50102への染色体組込みと、これに続く株VNP20009へのファージ形質導入、4) 株41.2.9-Tet-BRP-ABをもたすスクロース分離を示す図である。OriRKはプラスミド複製起点であり；mobRP4は、プラスミドを1つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。ampは、カルベニシリンおよびアンピシリン等のβ-ラクタム抗生物質に対する感受性を賦与するβ-ラクタマーゼである。sacBは、スクロースに対する感受性を賦与する遺伝子である。定尺度で表示していないことに注意。

【図34】

SKOV3細胞(平均数=8)に72時間暴露した後の、陽性および陰性対照(HSC10および41.2.9)と比較したtetBRPABクローン#26およびクローン#31の細胞毒性%を示す図である。ペロ毒素の発現は、テトラサイクリンにより誘導した(クローン26および31を参照)。テトラサイクリン治療あり(+); およびテトラサイクリン治療なし(-)。大腸菌株HSC10は、細胞毒性%の陽性対照として使用した。

【図35】

テトラサイクリンの不在下(1A)およびテトラサイクリンの存在下(1B)で、弱毒化腫瘍標的サルモネラの、血液系天上でのハロー形成を示す。また、テトラサイクリンの不在下(2A)およびテトラサイクリンの存在下(2B)で、構成的にSheAを発現するよう操作された弱毒化腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。さらに、テトラサイクリンの不在下(3A)およびテトラサイクリンの存在下(3B)で、テトラサイクリン誘導性SheAを発現するよう操作された弱毒化腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。

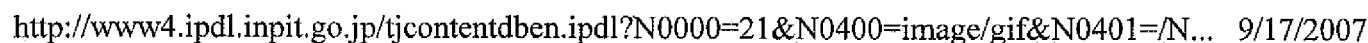
【図36】

(A) ヘキサヒスタジンタグを含まないTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。(B) ヘキサヒスタジンタグを含むTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。(C) OmpA-8Lシグナル配列を含むTAT-アポブチン融合タンパク質を示す。

【図37】

TAT-アポブチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA(配列番号57)

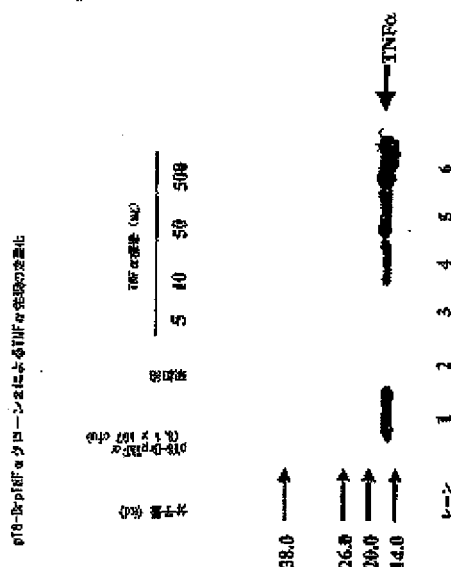
C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/シスプラチン
 組合せ治療の効力を示す図である。



(96)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【図 3】



【図 4】

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTC GCA GTC GCT GCT TTC
N K K T A I A I A V A L A S F

GCT ACC GTA GCG CAG GCG CAT ATG GTA GCT ACC TCG TCT GCG ACT
A T V A Q A H H V R S S S R T

DGG TCG GAT AAG CCG GTT GCT CAT GTA GTT GCT AAC CTT CAG GCA
P S D K P V A H V V A H P Q A

GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG AAC GGT GGT GCT AAC GCG CTG CTG
E S O L D M L N R R A H A L L

GCA AAC GCG GTT CAG CTG GGT GAT AAC CAG CTG GTG GTA GCT TGT
A H G V E L R D H Q L V V P S

GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT TCT CAA GGA CTG TAC AAG GGT CAG
E G L Y L I Y S Q V L F K S Q

GCG TCG CCG TCG ACT CAT GTT CTG CAG AGT CAG ACC ATC AGC CCG
G C P S T H V L L T H F I S R

ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC AAA GGT AAC CTG CTG AGC GCT ATC
T A V S Y Q T R V H L L S A I

AAG TCT CCG TCG CAG GGT GAA ACT CCG GCG GGT GCA GAA GCG AAA
K S P C Q R E T P E G A E A K

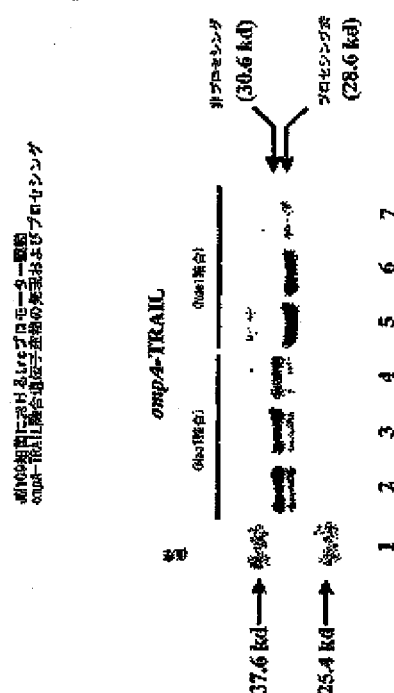
GCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC CCG GGT GCG GGA TTT CAG CTG GAG
P W Y E P I Y L D G V F G L D

AAA GGT GAC GGT CTG TGG GCA GAA ATC AAC GGT GGT GAC TAT CTA
K G D R L S A E J H R P O Y L

GAT TTC GCT GAA TCT GCG CAG GTC TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG
D F A G S G Q Y Y F G I E A L

TAA

【図 5】



【図 6】

ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTC GCA GTC GCT GCT TTC
N K K T A I A I A V A L A S F

GCT ACC GTA GCG CAG GCG CAT ATG GCT AAC GAG CAG AAC CAG AAG
A T V A Q A H H A H E L K K Q H

CAG GAC AAG TAC TCG AAA AAG GCG GTT GGT TGT TTC TTA AAA GAA
Q D K V S K S O I A C F L K E

GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCG AAT GAC GAA GAG AGT ATG AAC AGC
D D S Y H D P H D E E S H R S

CCC TCG TGG CAA GTT AAG TGG CAA CTG GAT CAG CTG GTT AGA AAG
P C M Q V K H Q L R D L F R K

ATG ATT TTG AGA GCG TCT CAG GAA ACC ATT TCT GCA GTT CAA GAA
H L L R S E T I S T V Q I

AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCG CTA CTG AAG GAA AGA GGT GCT CAG
K Q Q K J S P L V R S R G P Q

AGA GGA GCA GCT CAG ATA ACT GCG ACC AGA GGA AGA AGC AGC AGA
R V A A H I T G T M G R S R T

TTG TCT TCT CCA AAC TCG AAG AAT GAA AAG GCT CTG GAT AAA
L S S P H S K H E K A L G R K

ATG AAC TCG TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TTA TTC CTG AGC
I M S M E S S R S Q H S F L S

AAC TTG CAG TTG AAG AAT GGT GAA CTG GGT GTC CAT GAA GAA GGA
H L H L H H S E L V T M E X G

TTT GAG TAC GTC TAT TCG CAA AGA YAC TTT GGA TTT CAG GAG GAA
P Y V J Y S Q T Y F P F Q E U

ATA AAA GAA ACC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT
I K E H T K H D K D H V Q Y I

TTC AAA TAC ACA AGT TAT GGT GAC GGT GAT GAT TTG TTG AGA AGT
Y K V T S V P D P I L L E H K S

GCT AGA AAT AGT TGT TGG TCT GAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT
A R H S C H S K H A E Y G L Y

TCC ATC TAT CAA GCG GGA GGA TTT GAG CTT AAG GAA TAT GAC AGA
S I Y Q G G I F E L K E H D R

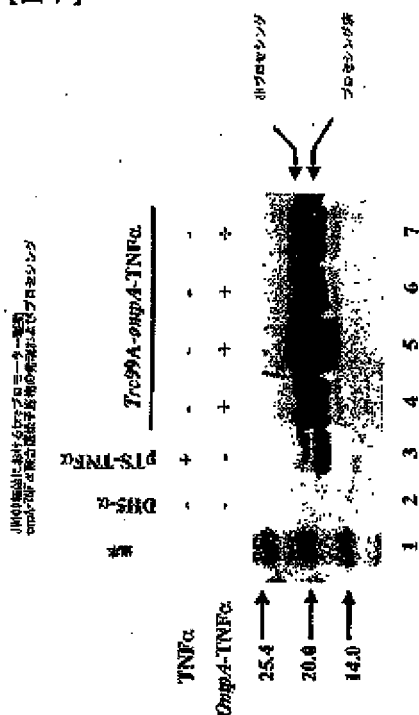
ATT TTT GAT TCT GTA AGA AAT GCG CAC TTG ATA GAT ATG GAG CAT
S F S S V T A E M L I D H D H

GCA GCG AGT TTT TTC GCG GCG TTT TTA GGT GCG TAA
E A S S P F G A F L V E Y

(97)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

【図 7】



【図 8】

ATG AAA AAG AGC GCT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG GTG
N K K T A L A L L L L L L L A L

ACT AGT GTA GCG CAG GCG GCT GCT ACT AGC TGG AGC ACT AAG AAA
T S V A Q A A P T S S S T K K

ACT GAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
T Q L Q L E H L L L L L L Q N I

CTG AAT GCG ATC AAT AAC TAC AAG AAC GGT AAG CTG ACT GCG ATG
L N G I N H Y K N P K L T R N

CTG ACT TTC AAA TTC TAC AAG GCG AAG AAG GCT AGC GAG CTC AAA
L T F K F Y M P K K A T E L K

GAT CTG CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG GCG CTG GAG GAA GTA
H L Q C L E E E L K P L E E Y

GTT AAG CTG GGA CAG TCT AAG AAC TTC CAG CTG GGT GCG GGT GAG
L N L A Q S K R F H L R P R D

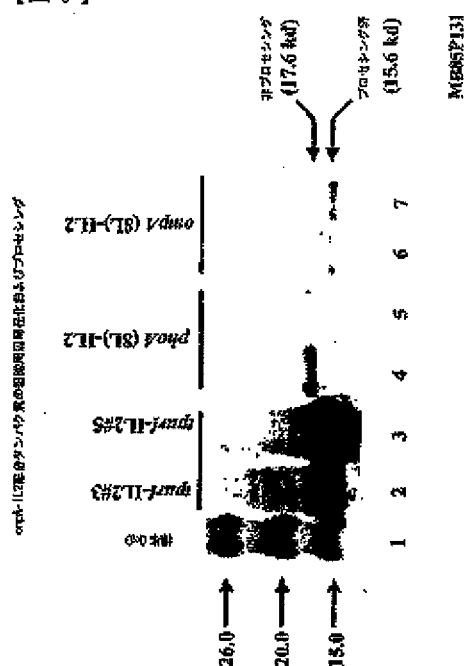
CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT GAT GAG CTG AAG GGA TCC
L I S N I H Y I Y L E L K G S

GAA AGC AGC TTC ATG TGC GAA TGC GCT GAC GAA AGC GCG AGC ATT
E T T F H C E Y A D E T A V I

GTC GAG TTC CTG AAG GGT TGG ATC ACC TTT GCG CAA TCG ATC ATT
V E F L H R M I Y F A Q S S I

AGC AGC TTA ACT TAA
S T L Y *

【図 9】



【図 10】

ATG AAA CAG TCG ACT CTG GCG CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG GTG
N K G S T L A L L L L L L L A L

ACT AGT GTA GCG AAA GCG GCT GCT ACT AGC TGG AGC ACT AAG AAA
T S V A K A A P T S S S T K K

ACT GAA CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
T Q L Q L E H L L L L L L Q N I

CTG AAT GCG ATC AAT AAC TAC AAG AAC GGT AAG CTG ACT GCG ATG
L N G I N H Y X N P K L T R N

CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG GCG AAA AAG GCT AGC GAG CTC AAA
L T F K F Y M P K K A T E L K

GAT CTG CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG GCG CTG GAG GAA GTA
H L Q C L E E E L K P L E E Y

GTT AAG CTG GGA CAG TCT AAG AAC TTC CAG CTG GGT GCG GGT GAG
L N L A Q S K H F H L R P R D

CTG ATC TCC AAC ATC AAT GTA ATC GTT GAT GAG CTG AAG GGA TCC
L I S N I H Y I Y L E L K G S

GAA AGC AGC TTC ATG TGC GAA TGC GCT GAC GAA AGC GCG AGC ATT
E T T F H C E Y A D E T A V I

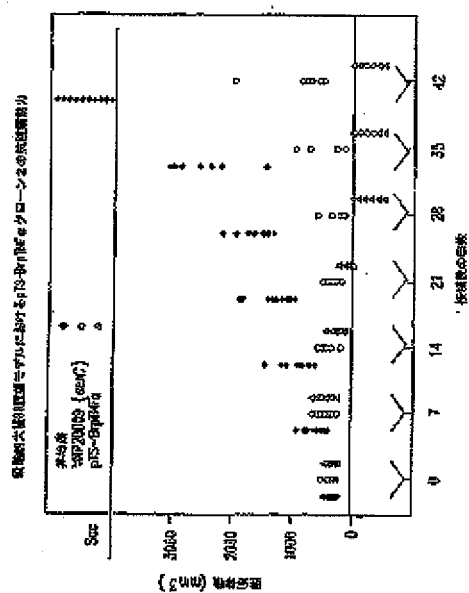
GTC GAG TTC CTG AAG GGT TGG ATC ACC TTT GCG CAA TCG ATC ATT
V E F L H R M I Y F A Q S S I

AGC AGC TTA ACT TAA
S T L Y *

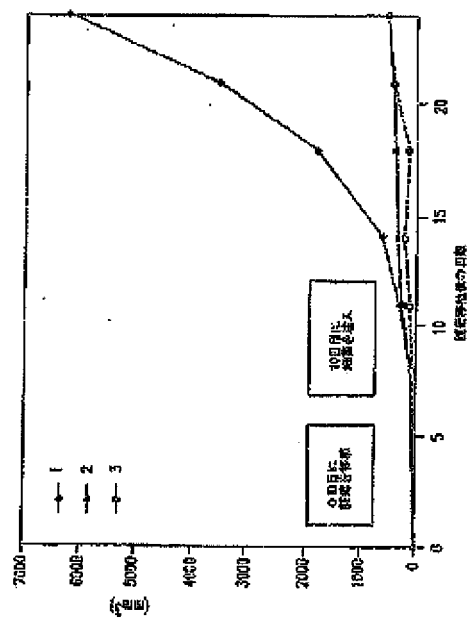
(98)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

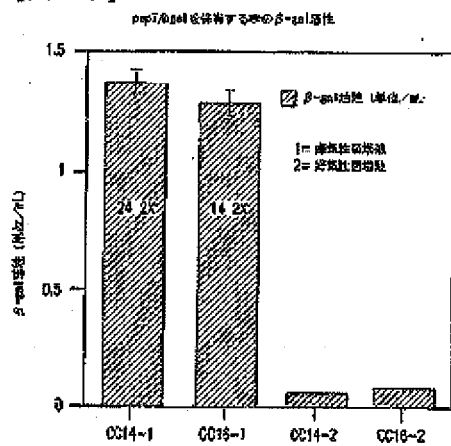
【図 1 1】



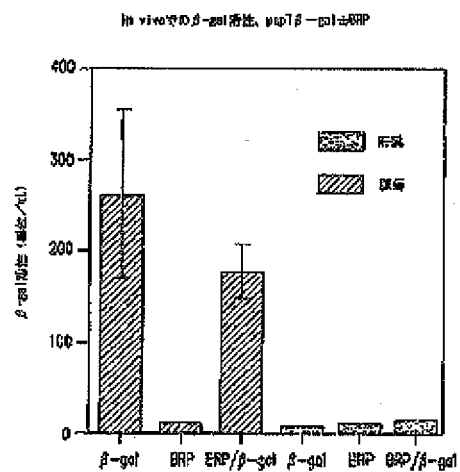
【図 1 2】



【図 1 3】



13A

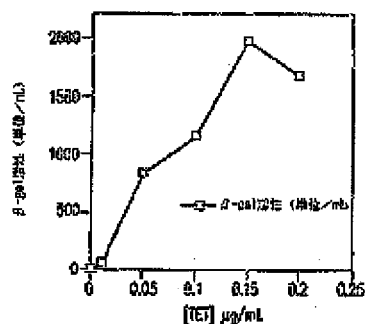


13B

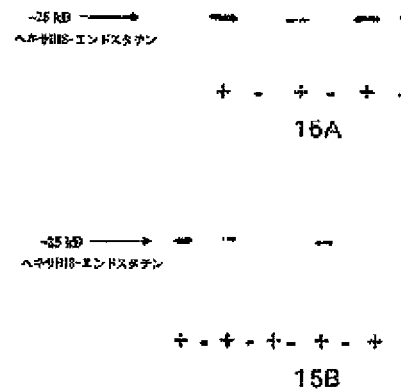
(99)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

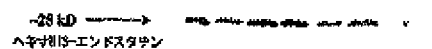
【図 14】

TEIプロモーターを用いた β -galの発現

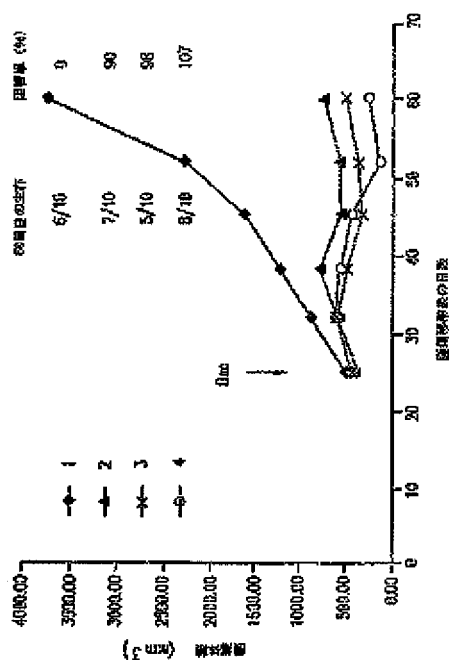
【図 15】



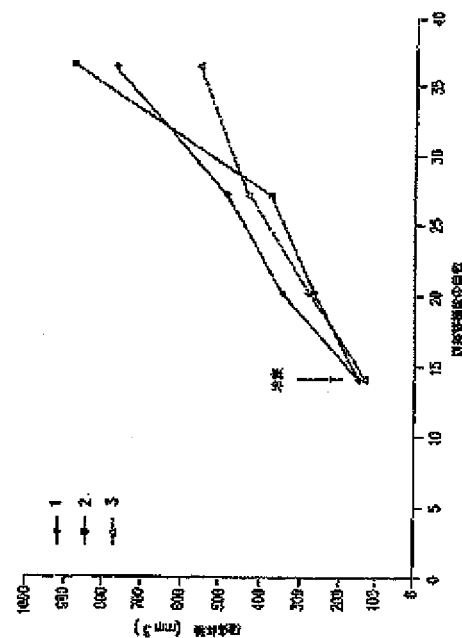
【図 16】



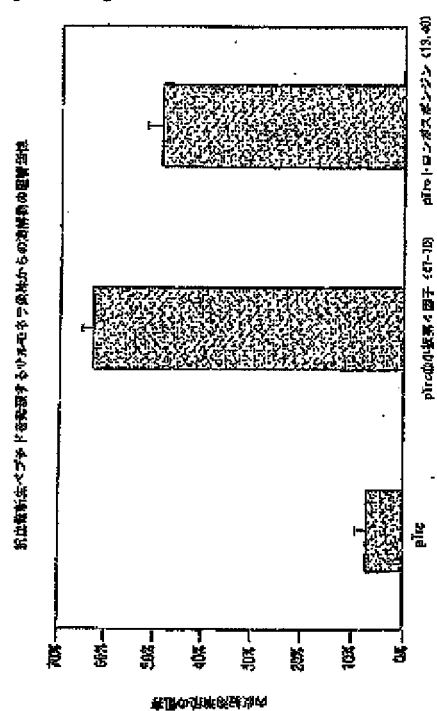
【図 17】



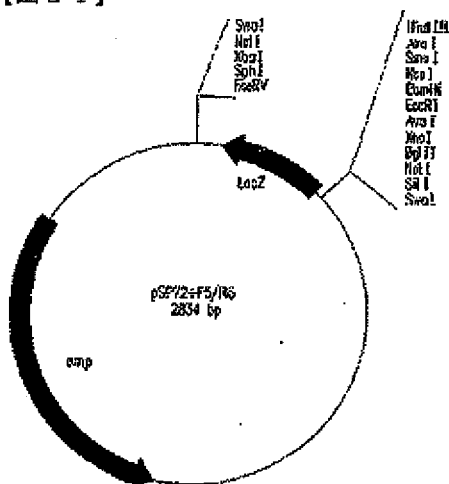
【図 18】



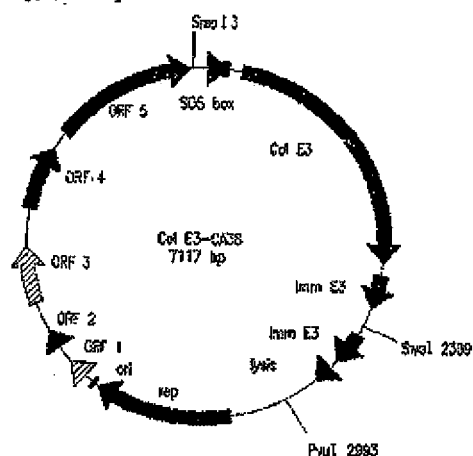
【図 20】



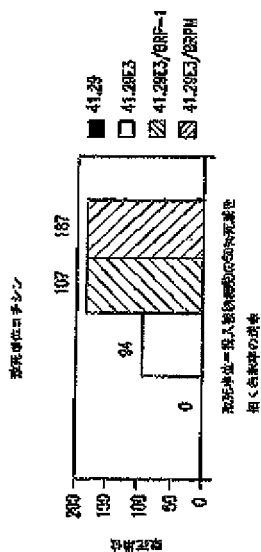
【図 2 1】



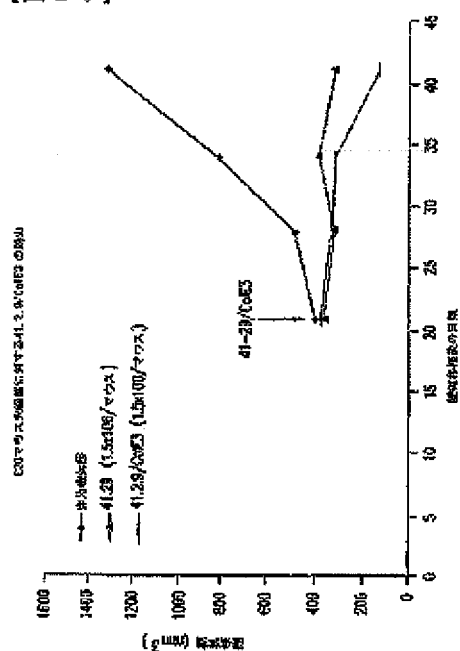
【图 2 2】



【例 2.4】



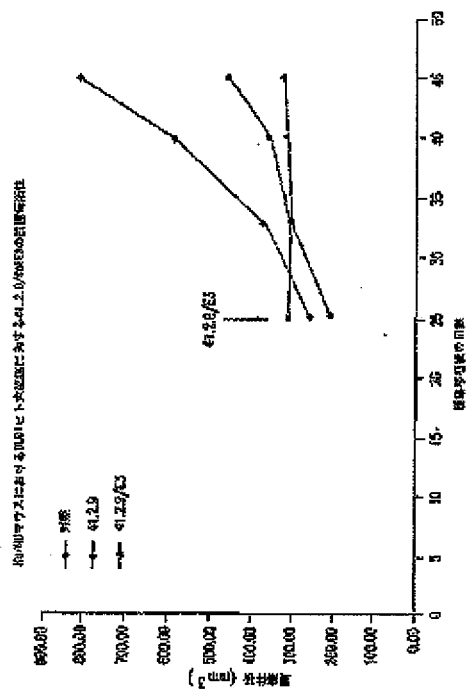
【图 26】



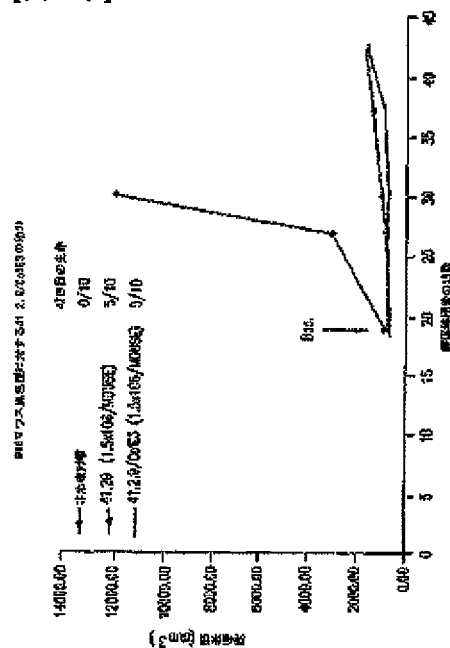
(102)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

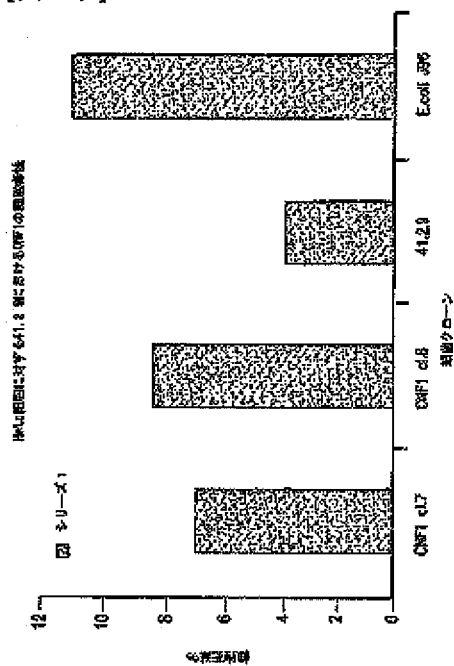
【図 27】



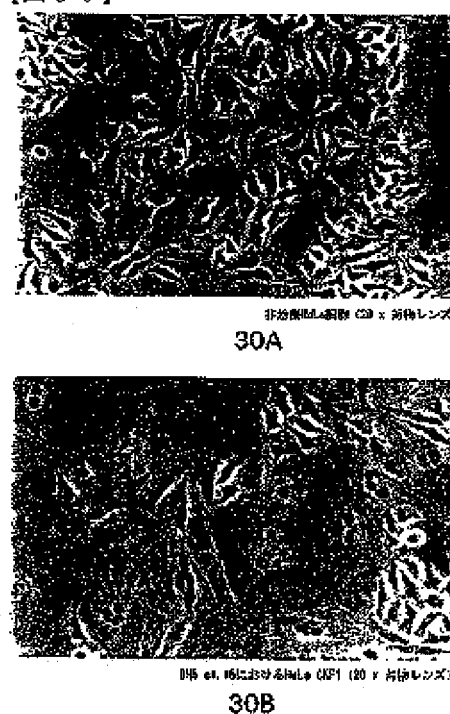
【図 28】



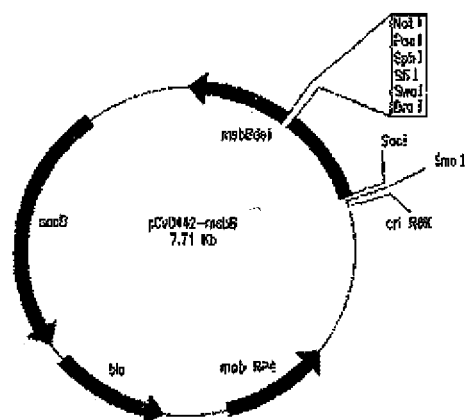
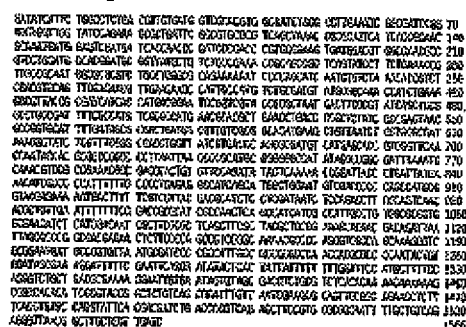
【図 29】



【図 30】

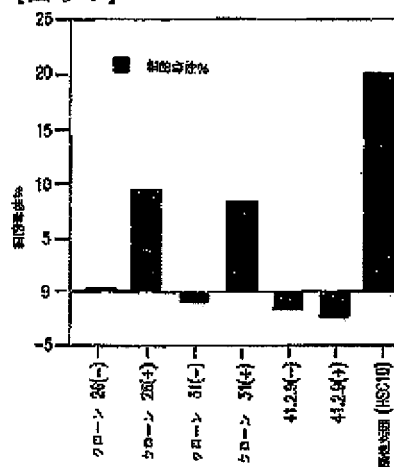
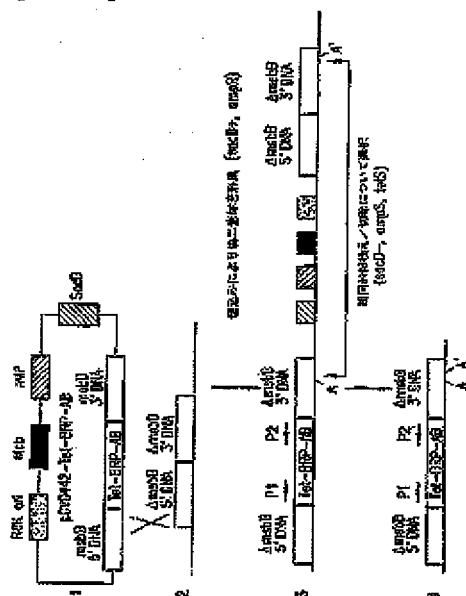


【圖 3 2】



【图 3-3】

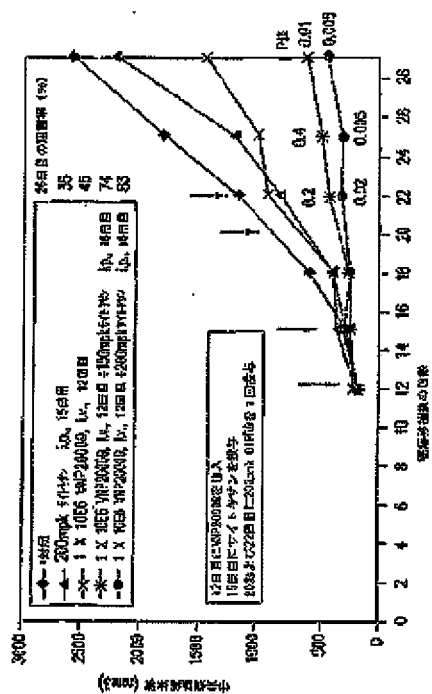
【圖 34】



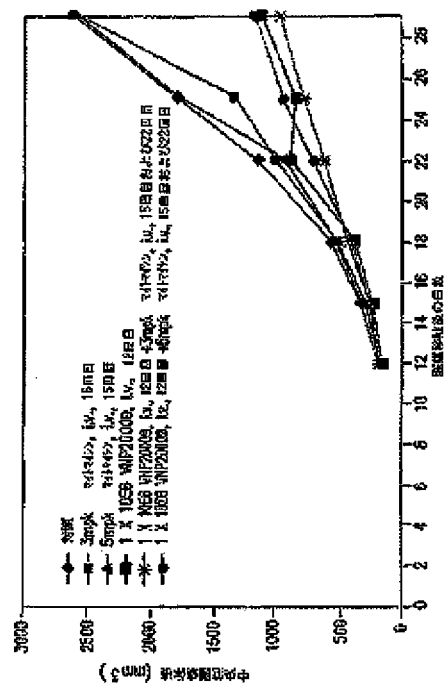
(105)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

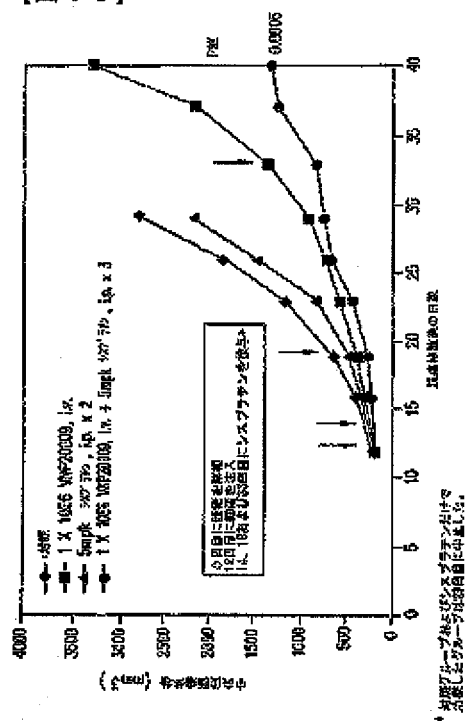
【図 39】



【図 40】



【図 41】



CONFIDENTIALITY AND APPLICATION FOR WORK UNDER THE PATENT COMPENSATION ACTS (PCA)

Abstract

ECT

WORLDWIDE PUBLICATION NUMBER
WD 0125397 A2

Road, New Haven, CT 06424 (US). CLARENCE H. WILSON, A. (USAUS). 30 WILSON CHURCH, CHESHAM, CT 06410 (US). LYN. SPENCER, L. (USAUS). 170 Old Road, Bridge, New Haven, CT 06424 (US). BRUCE WILSON, A. (USAUS). 9 Algonquin Drive, Waterford, CT 06424 (US).

સર્વોચ્ચ નિર્ણયકર્તા સ્થાન પર આવેલા નેતા: 75.41.51.52.53

636 International Finance Date: 24 August 2005/24 August 2005

© 2009 Wiley Periodicals, Inc. *Journal of Management Education* 33(10)

(49 FUDNCH) Language English

Family Data:		
4057181	4 Christ 1939 (04.10.1939)	1/8
4057181	4 Christ 1939 (04.10.1939)	1/8
4057187	4 Christ 1939 (04.10.1939)	1/8

[illegible]

අපි ප්‍රකාශනයක් ලෙස

David G. RIVERS, 524 North Side Drive, Raleigh, N.C. 27604; and
 CT 06414; and
 Mrs. F. GIBBS, 65 Fox Hill

(d) Designated States (Albania; AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BY, SZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EE, ES, FI, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LA, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MV, MW, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TJ, TZ, UG, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW)

(09) Болгарски Едини (русски). Антип глук. О.б.
82. 1.5. 1948. 142. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841. 842. 843. 844. 845. 846. 847. 848. 849. 850. 851. 852. 853. 854. 855. 856. 857. 858. 859. 860. 861. 862. 863. 864. 865. 866. 867. 868

(Continued on next page)

(14) TITLE: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-FAVORING INHIBITORS OF EFFECTOR MOLECULES

[illegible]

WFO 01/25397 A2

[illegible]

(108)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/337

PCT/JP01/024

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TUMOR-TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES

This application claims priority to U.S. provisional patent applications Nos. 60/137,500, 60/137,501, and 60/137,637, filed on October 6, 1999, the contents of each of which is incorporated herein by reference in entirety.

1. FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the delivery of one or more primary effector molecules to a solid tumor for the treatment or inhibition of the tumor. More particularly, the invention is related to the preparation and use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecules to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention is a facultative anaerobe or facultative anaerobe which is modified to encode one or more primary effector molecule(s). The primary effector molecule(s) of the invention include members of the TNF cytokine family, anti-angiogenic factors, and cytotoxic polypeptides or peptides. The primary effector molecules of the invention are useful, for example, to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, sarcoma, or metastases derived from these tumors. The invention further relates to the surprising discovery that primary effector molecule(s) such as TNF family members, anti-angiogenic factors, and cytotoxic polypeptides or peptides can be delivered directly to tumors by attenuated tumor-targeted bacteria with reduced toxicity and reduced immunological complications to the host. The invention also relates to the delivery of one or more secondary effector molecule(s) (termed "secondary effector molecules") which may be delivered by the attenuated tumor-targeted bacteria in conjunction with the primary effector molecule(s). The secondary effector molecule(s) provide additional anti-tumor therapy; e.g., enhance release of the primary effector molecule(s) from the attenuated tumor-targeted bacteria, and/or enhance uptake of the primary effector molecule(s) at the appropriate site of action, e.g., at the site of a solid tumor.

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

A neoplasm, or tumor, is a neoplastic mass resulting from abnormal cell growth, which can be benign or malignant. Benign tumors generally remain localized. Malignant tumors generally have the potential to invade and destroy neighboring body tissue and spread to distant sites and cause death (for review, see Robins and Auer, 1976, Basic

(109)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/0001/2004

CYTOKINES

Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122). A tumor is said to have metastasized when it has spread from one organ or tissue to another.

A major problem in the chemotherapy of solid tumor cancers is delivery of therapeutic agents, such as drugs, in sufficient concentrations to eradicate tumor cells while at the same time minimizing damage to normal cells. Thus, studies in many laboratories are directed toward the design of biological delivery systems, such as antibodies, cytotoxics, and viruses for targeted delivery of drugs, pro-drug converting enzymes, and/or genes into tumor cells (see, e.g., Crystal, R. G., 1995, *Semin. Oncol.* 22:408-410).

3.1. CELLULAR IMMUNITY AND CYTOKINES

- One strategy for the treatment of cancer involves enhancing or activating a cellular immune response. Successful induction of a cellular immune response directed toward a neoplastic tumor offers several advantages over conventional chemotherapy: 1) immune recognition is highly specific, being directed exclusively toward tumors; 2) growth at metastatic sites can be suppressed through immune surveillance; 3) the diversity of immune receptors and recognition can compensate for different resistance mechanisms employed by tumor cells; 4) clonal expansion of cytotoxic T cells can occur more rapidly than the expanding tumor, resulting in an immune mechanism which ultimately overcomes the tumor; and 5) a memory response can suppress disease recurrence in its earliest stages, prior to physical detection. Clinical studies of responding patients have borne out results from animal models demonstrating that successful immunotherapy involves the activation of CD8⁺ T cells (class I response), although evidence exists for participation of CD4⁺ T cells, macrophages, and NK cells. See, e.g., Chapiro *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:6977-6984; Orlitzky *et al.*, 1998, *J. Clin. Invest.* 102:561-575; Kikuchi *et al.*, 1999, *Int. J. Cancer* 80:425-430; Pan *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 60:425-430; Salter *et al.*, 1996, *Cancer Gene Ther.* 3:371-379; and Ziemer *et al.*, 1999, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 894:284-290.

3.2. TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) FAMILY OF CYTOKINES

- The best characterized member of the TNF family is TNF- α . TNF- α is known to exert pleiotropic effects on the immune system. TNF- α is a cytokine which can exert potent cytotoxic effects directly on tumor cells. TNF- α is generally thought to exert its anti-tumor effect via other mechanisms such as stimulation of proliferation and differentiation, and prevention of apoptosis in macrophages (see, e.g., Marzouk *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:1541-1545; and Orlitzky *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 161:4155-4161), promotion of class II molecule processing activity and suppression of endothelial cell surface anticoagulant activity, ultimately leading to clot formation within the tumor (reviewed in Beutler and Cerami, 1989, *Ann. Rev. Immunol.* 7:625-665; and Vercelli, P.,

(110)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W/O 01/28/97

PCY00001101

1992, *Ann. Rev. Immunol.* 10:411-432). However, as a result of these properties, systemic administration of TNF- α results in local consequences in the host due to disseminated intravascular coagulation.

Other cytokines have also been implicated in anti-tumor responses. IL-2 is a direct cytokine and is also thought to play a role in anti-tumor response. For example, spontaneously regressing melanomas have been associated with elevated (normal) levels of TNF- α and IL-2. See, e.g., Bourlax and Carsons, 1995, *Ann. Rev. Immunol.* 7:625-653; Lowes *et al.*, 1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:914-919; Mangan *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:1541-1546; Scherlich *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138: 1786-1790.

Both TNF- α and IL-2 aid in lymphocyte homing, and IL-2 has been shown to induce tumor infiltration of natural killer (NK) cells, T-cells, and lymphokine activated killer (LAK) cells (see, e.g., Baur *et al.*, 1978, *Cytokines* 10:395-403; Relinski *et al.*, 1997, *Diff. 89:3831-46*; Chen *et al.*, 1997, *J. Neurosurg. Exp. Neurol.* 56:54-59; Vega *et al.*, 1996, *Clin. Exp. Immunol.* 105:155-62; Luskinder *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157:326-33; Kjaergaard *et al.*, 1998, *Scand. J. Immunol.* 47, 532-540; Johansson *et al.*, 1994, *Nat. Immun.* 1:57-77; and Watanabe *et al.*, 1997, *Am. J. Pathol.* 150:1859-30). In the presence of both TNF- α and IL-2, the cytolytic activity of NK and LAK cells is increased, even when directed against TNF-resistant cell lines (see, e.g., Coleman *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138:4183-4191). However, therapeutic levels of IL-2 have also been shown to be toxic to the host.

Clearly, dose-limiting toxicity from systemic cytokine administration poses a significant barrier to realizing the potential of cytokines in cancer therapy. Moreover, systemic cytokine delivery can result in decreased homing of syngeneic T cells, thus opposing targeted immunotherapy, in addition to resulting in unwanted clinical side effects. See Addison *et al.*, 1998, *Gene Ther.* 5:1401-1409; Alterini *et al.*, 1997, *Clin. Cancer Res.* 3:1277-1288; Becker *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7828-7831; Berk *et al.*, 1998, *J. Neuroimmunol.* 92:50-58; Cao *et al.*, 1998, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124:83-92; D'Angelica *et al.*, 1999, *Cancer Immunol. Immunother.* 47:265-271; Doseo *et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.* 2:1543-1552; Kjaergaard *et al.*, 1998, *Scand. J. Immunol.* 47:532-540; Ojensen *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 138:4185-4191; and Schirmacher *et al.*, 1998, *Clin. Cancer Res.* 4:2635-2645.

1.3. DELIVERY OF CYTOKINES

Recent experimental animal and clinical studies have attempted to bypass systemic toxicity of cytokines and administer higher doses, through sub-cutaneous or alternative methods of delivery of cytokines. In murine models, carcinoma-180 tumors have been treated with administration of a liposome-encapsulated TNF- α gene, and systemic administration of polyethylene glycol-conjugated TNF- α , which could localize

(111)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

02/01/2004

PCT/JP00/02242

to the tumor vasculature (see Takizumi *et al.*, 1996, *Jpn. J. Cancer Res.* 87:1078-1085).
 Seminalization of tumors to TNF- α by endothelial-nitric oxide synthase polypeptide II has
 also been reported (see, Marvin *et al.*, 1999, *J. Surg. Res.* 63:248-253; Wu *et al.*, 1996,
Cancer Res. 56:200-212).

In clinical studies, complete tumor eradication has been observed following high-
 dose TNF- α administration to patients via isolated limb perfusion, in combination with
 interferon- γ or streptozin. However, this technique presents severe risks to the patient if
 the cytokines are not completely removed following treatment. Further, these treatments
 require limb isolation, which, in itself presents risks to the patient. See Aggarwal *et al.*,
 1997, *Semin. Oncol.* 24:347-355; Friess *et al.*, 1995, *Cancer J. Sci. Am.* 1:122-130;
 Lejune *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Immunol.* 10:373-380; Marino *et al.*, 1996, *J. Surg. Res.*
 63:248-253; Mitsunishi *et al.*, 1998, *Cancer Res.* 58:5725-5730; Todoroki *et al.*, 1996, *Jpn.*
J. Cancer Res. 87:1078-1085, and Wu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:200-212.

Previous studies by Carter *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1176-81; Salzman *et al.*,
 1997, *Cancer Biotech. Bioeng.* 12:37-45; Salzman *et al.*, 1997, *J. Pediatr. Surg.*
 32:301-306 have reported the use of attenuated *Salmonella* strains to deliver IL-12
 (Carter) and IL-2 (Salzman) directly to the liver and spleen, the natural sites of *Salmonella*
 infection, to serve as vaccine adjuvants or other hepatic vaccines. Salzman's studies used
 oral administration of *Salmonella* in which bacteria are taken up by GALT (gut associated
 lymphoid tissue) and transported to liver and spleen. However, these infections are limited
 to the natural sites of infection.

2.1. ANGIOGENESIS AND TUMORIGENESIS

Another strategy for the treatment of cancer involves the inhibition of angiogenesis.
 Angiogenesis is the process of growth of new capillaries from preexisting blood vessels.
 New capillaries are formed by a process in which the endothelial cells of the preexisting
 blood vessel, using proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases, degrade the
 basement membranes in their vicinity, proliferate, migrate into surrounding stromal tissue
 and form microvessels. The process of angiogenesis is very tightly regulated by an interplay
 between negative and positive factors, and in adults is normally restricted to the female
 reproductive cycle and wound repair (Majumder *et al.*, 1999, *Cell. Exp. Molec. Res.* 17:1-14).
 Abnormal or aberrant regulation of angiogenesis has been implicated in many human
 diseases, including diabetic retinopathy, psoriasis, rheumatoid arthritis, endometriosis,
 fibrosis, and tumorogenesis (Folman, 1993, *Med. Med.* 1:27-31).

Angiogenesis is a critical process for tumor growth and metastasis. Tumor
 formation is divided into two stages, the prevascular and vascular stages. Studies have
 shown that cells of prevascular tumors proliferate as rapidly as cells from vascularized
 tumors. However, prevascular tumors rarely grow to more than 2-3 mm³ because of the

(112)

JP 2004-505042 A 2004.1.8

WO 01/5229

PCY00001241

existence of an equilibrium between cell proliferation and cell death, the latter resulting from the typical nature of the provascular tumor (Folkman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31). The switch from the precursor to vascular stage requires a shift in the balance of the regulatory factors of angiogenesis from a net balance favoring negative factors to one in which the positive factors, such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), predominate (Cao, 1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 25:161-176). The shift in balance between regulatory factors is a result of the up-regulation of the angiogenic factors and the simultaneous down-regulation of anti-angiogenic factors (Folkman, 1995, *N. Eng. J. Med.* 333:1757-1763).

23. ANTI-ANGIOGENIC FACTORS

Anti-angiogenic factors were postulated to exist on the basis of several related phenomena that led to the conclusion that primary tumors often inhibited the growth of their metastases (Cao, 1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20:161-176). The first of these factors to be isolated was mouse angiostatin, a 38 kDa proteolytic fragment of plasminogen that is released into the circulation by primary Lewis lung carcinomas tumors and prevents the growth of secondary metastases (O'Reilly *et al.*, 1994, *Cell* 79:315-328). In humans, peptides of 40, 42 and 45 kDa produced by the limited proteolysis of plasminogen with metalloproteinases have anti-angiogenic activity comparable to mouse angiostatin (O'Reilly *et al.*, 1994, *Cell* 79:315-328). Angiostatin itself has no such activity. It is also thought that tumor-associated metalloproteinases are responsible for the production of angiostatin, since tumor cells themselves have no detectable angiostatin mRNA. Macrophage metalloproteinase expression is induced by granulocyte colony stimulating factor (GM-CSF) secreted by the tumor cells (Wang *et al.*, 1997, *Cell* 82:801-810). In certain tumors, angiostatin production is catalyzed by aspartic proteases rather than metalloproteinases, whereas serine proteases are produced directly by the tumor cells (Gately *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 56:4837-4850). Administration of angiostatin at a concentration of 100mg/kg/day to experimental mice with primary tumors resulted in a strong inhibition of tumor growth without toxic side effects. The tumors regrew within 2 weeks of cessation of the angiostatin treatment, indicating that the tumors regress into a dormant state rather than regressively die as a result of the treatment (O'Reilly *et al.*, 1996, *Nat. Med.* 2:618-622).

After the discovery of angiostatin, other angiogenesis inhibitors, including several angiogenesis-inhibiting peptides, were discovered and isolated. A more potent inhibitor of angiogenesis than angiostatin is kunitz 5, a peptide comprising the fifth kunitz domain of plasminogen (angiostatin comprises kunitz domains 1-4). Kunitz 5 can be produced by the proteolysis of plasminogen, and recombinant forms are also active (Cao *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:22934-22938).

(113)

JP 2004-505042 A 2004.1.8

WO 01/25297

PCT/US99/02146

- Endostatin was isolated as a dimer similar to the isolation of angiotensin (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20), the source being a murine hemangioendothelioma rather than a Lewis lung carcinoma. The peptide has an apparent molecular mass of 20 kDa whose sequence corresponds to the C-terminal of collagen XVIII (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20), a region called NC1 that is cleaved along various collagen molecules (Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4226-4233; and Reba et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4238). In mice, the growth of Lewis lung carcinoma metastasis is suppressed by the administration 0.3 mg/kg/day of recombinant endostatin, and the primary tumor regresses to a dormant size when the peptide is administered at 20 mg/kg/day. Recombinant recombinant endostatin can be produced from infectious vectors, either in vitro by fermentation and refolding, or in vivo by the sustained release of subcutaneously administered endostatin into tumor beds (O'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20).
- An alternative method of endostatin delivery consisting of intratumoral administration of an endostatin expression plasmid results in only the partial inhibition of tumor growth in a mouse model system (Blackburn et al., 1995, Nat. Biotech. 17:143-148). Similarly, endostatin or angiotensin-converting plasminase compounds that was delivered intravenously resulted in a partial inhibition of tumor growth in a nude mouse model of breast cancer (Cline et al., 1999, Cancer Res. 59:3303-3312).
- Recently, a novel anti-angiogenic activity has been attributed to a C-terminal mucosin peptide of the Solpiti (Solpiti Peptide Inhibitor) anti-angiogenic (O'Reilly et al., 1999, Science 285:1526-1528). Full length anti-thrombin has no inherent anti-angiogenic activity, but upon cleavage of the C-terminal sensitive loop of the protein by thrombin, anti-thrombin acquires potent anti-angiogenic activity. The proteolytic fragment is referred to hereinafter as anti-angiogenic anti-thrombin.
- Other angiogenesis-inhibiting peptides known in the art include the 25 kDa N-terminal and a +6 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin (Rosenberg et al., 1985, J. Am. Physiol. 128:317-332), the 16 kDa proteolytic fragment of perlecan (Copp et al., 1995, Radiocology 139:1292-1293), and the 7.1 kDa proteolytic fragment of platelet factor-4 (Copp et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7799-7803).
- In addition to those naturally produced proteolytic fragments that have demonstrated anti-angiogenic effects, several synthetic peptides that correspond to regions of known extracellular matrix proteins have been assessed for activity in inhibiting angiogenesis. Synthetic peptides which have been demonstrated to be functional endothelial inhibitors, i.e. angiogenesis inhibitors, include a 13 amino acid peptide corresponding to a fragment of laminin-1 (Mason et al., 1994, Cancer Res. 54:2077-2082); a 14 amino acid peptide corresponding to a fragment of collagen I (Tolosa et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511); a 19 amino acid peptide corresponding to a fragment of Thrombospondin 1 (Tolosa et al., 1993, J. Cell Biol. 122:677-511); and a 20 amino acid

(114)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/03303

EXTRACTS

peptide corresponding to a fragment of SPARC (Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334), a secreted cysteine-rich extracellular matrix glycoprotein whose expression in human carcinoma cells leads to enhanced cellular invasion *in vitro* and reduced tumorigenicity in an *in vivo* nude mouse model (Lodish et al., 1996, Nature Med., 2:171-176).

Other peptides of less than 10 amino acids that inhibit angiogenesis and are related to fragments of laminin, fibronectin, procollagen, and RGD have also been described (see the review by Cao, 1998, Prog. Mol. Biol. Cell. Biol. 20:161-176).

The small fibronectin peptides that inhibit angiogenesis generally comprise the motif RGD. RGD is a peptide motif (amino acids Arg-Gly-Asp) used by proteins for recognition and binding to integrin receptors. The expression of integrin $\alpha_5\beta_1$ is associated with angiogenic blood vessels and inhibition of its activity by monoclonal antibodies blocks vasculogenesis (Birkholz et al., 1994, Science 264:569-571). This has been confirmed by a study showing that the administration of cyclic pentapeptides containing the RGD motif inhibits the activity of vitronectin receptor-type integrins and block retinal neovascularization (Birkholz et al., 1996, Nature Medicine 2:524-533). The anti-angiogenic effect of integrin blockers on cyclic pentapeptides and monoclonal antibodies has been shown to promote tumor regression by limiting the deposition of angiogenic blood vessels (Birkholz et al., 1994, Cell 79:1157-1164). Peptides comprising the RGD motif, and another integrin binding motif, NOB (amino acids Asn-Gln-Arg), showed markedly enhanced anti-tumor activity.

The inhibition of the activity of another type of cell surface receptor, namely the protease plasminogen activator (uPA) receptor, also results in the inhibition of angiogenesis. The uPA receptor, upon ligand binding, initiates a proteolytic cascade that is necessary for the basement membrane invasion step of angiogenesis. Inhibition of the uPA receptor by receptor antagonists inhibits angiogenesis, tumor growth (Mao et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433) and metastasis (Crowley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5021-5025). Such compounds have been identified by recombinant peptide display of random peptides (Cronina et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7122-7130). Dominant negative forms of the receptor's ligand, uPA, have also been identified (Beli et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433).

While the discovery of angiogenic, co-ordinating and other anti-angiogenic peptides provided an exciting new approach for cancer therapy, the reality of a course of treatment involving one or more of these peptides is the impracticality of the production of numerous amounts of peptides (starting from the cost and/or labor of having to produce, for an average person of 67 kg or 143 lbs, approximately 1.5 or 6.5 grams of protein per day, depending on the peptide) and the duration of the treatment (which has to be sustained if the tumor is to stay in regression). It is thought that the two main reasons that these peptides have to be administered in such large quantities are that, first, a majority are

(115)

JP 2004-500042 A 2004.1.18

WO 01/22247

PCT/JP00/01247

regarded in the blood stream and, second, of the obstacles that the active degradation only a very limited proportion make their way to the tumor. Thus, it would be a great advantage to the field of tumor therapy if anti-tumor proteins or peptides could be delivered more efficiently to the tumor and in a more cost-effective and patient-friendly manner.

2.6. BACTERIOCIN FAMILY

Colicin ES (referred to hereafter as ColE3) is a bacteriocin, i.e., a bacterial proteinaceous toxin with selective activity, in that its host is immune to the toxin. Bacteriocins may be encoded by the host genome or by a plasmid, may have a broad or narrow range of hosts, and may have a simple structure comprising one or two subunits or may be a multi-subunit structure (Kostsky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144). In addition, a bacteriocin host has an immunity against the bacteriocin. The immunity is found in all cells of a given host population, even those that do not express the bacteriocin.

The cytotoxicity of ColE3 results from its inhibition of protein synthesis (Nagawa, 1963, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:315-334). The target of ColE3 activity is the 16S component of bacterial ribosomes, which is common to the 50S and 70S ribosomes (Bowman *et al.*, 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:964-968), and this activity results in the degradation of the ribosome (Shaykhet, 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*). ColE3 activity is unique among ribonucleases, in that it does not cause the overall degradation of rRNA, but cleaves rRNA molecules 49 nucleotides from the end, resulting in the separation of the rRNA from the rRNA and thereby inhibiting translation. The ribonuclease activity of ColE3 resides in the exosome itself, rather than being mediated by another protein (Samadpour, 1976, *Nature* 276:113-116). ColE3 is also able to permeate the inner and outer membranes of the target cell.

In its naturally occurring form, ColE3 is a 66kDa protein complex consisting of a 50kDa and a 16kDa protein in a 1:1 ratio, the larger subunit having the nuclease activity and the smaller subunit having inhibitory function of the 50kDa subunit. Thus, the 50kDa protein acts as a cytotoxic protein (or toxin), and the 16kDa protein acts as an anti-toxin. The 50 kDa subunit comprises at least two functional domains: an N-terminal region required for translocation across target cell membranes, and a C-terminal region with catalytic (RNAse) activity. Within the host organism, the activity of the large subunit is inhibited by the small subunit. The subunits are thought to dissociate upon entry of the toxin into the target cell as a result of interaction with the target cell's outer membrane (reviewed by Kostsky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36:123-144).

The toxicity of the large subunit of ColE3 has been utilized to prevent the lateral spread of cloned genes among microorganisms. Tsig *et al.* (1994, *Mol. Microbiol.* 83:854-861) expressed the two components of ColE3 such that the small (anti-toxin) subunit was

(116)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO/01/08497

CYTOKINES

expressed as a chromosomally integrated coding sequence and the large subunit was expressed from a plasmid. Bacteria with the chromosomally integrated small subunit are incapable of plasmids that express the ColE1 large subunit, but if the plasmid were to be laterally transferred to another recipient that lacked the small subunit, the cell would be killed.

- Colicin B3 (ColB3) has also been shown to have a profoundly cytotoxic effect on mammalian cells (see Suzuki *et al.*, 1978, *Folia Microbiol.* 23:273-277), including a leukemia cell model system (see Fuku *et al.*, 1979, *Experientia* 35:406-407). ColB3 activity targets the 40S subunit of the 80S mammalian ribosome (Turner *et al.*, 1973, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 52:327-334).

10

2.7. BACTERIAL INFECTIONS AND CANCER

Early clinical observations reported cases in which certain cancers were reported to regress in patients with bacterial infections, see Klaus *et al.*, 1953, *Acta Medica Scandinavica* 145:1-102, (Suppl. 276); and Sbrus, 1990, *J.A.M.A.* 263:383-389. Since

15

these observations, Lee *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1847-1851 (Lee *et al.*) and Jones *et al.*, 1992, *Infect. Immun.* 60:2473-2480 (Jones *et al.*) isolated mutants of *Salmonella typhimurium* that were able to invade HEp-2 (human epidermal carcinoma) cells *in vitro* at significantly greater numbers than the wild-type strain. The "hyperinvasive" mutants were isolated under conditions of aerobic growth of the bacteria that normally repress the ability of wild-type strains to invade HEp-2 cells. However, such hyperinvasive *Salmonella typhimurium* as described by Lee *et al.* and Jones *et al.* carry the risk of post-invasive tubercles and could lead to widespread bacterial infection in the cancer patient.

20

Curran *et al.*, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3665-3669, demonstrated that mice infected with bacillus Calmette-Guérin (BCG) have increased serum levels of TNF and that TNF gene-deficient mice caused cessation of the bacterial Methyl A and other transplanted tumors *in vivo*. As a result of such observations, immunization of cancer patients with BCG injections is currently utilized in some cancer therapy protocols. See Sznajder, 1994, *Cancer Ther.* 26:695-701; Barth and Markov, 1995, *Cancer* 75 (Suppl. 3):726-734; Fritling, 1993, *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 10:31-36 for reviews of BCG therapy.

25

However, TNF-mediated reperfusion shock is among the primary concerns associated with bacteria, and one has toxic or lethal consequences for the host (Dorn, 1992, *J.A.M.A.* 268:1452-1453; Dinarello *et al.*, 1993, *J.A.M.A.* 269:1829-1833). Thus, the striking systemic toxicity of TNF- α has been the major barrier to effective clinical use.

30

Modifications which reduce this form of an immune response would be useful because TNF- α levels would not be toxic, and a more effective concentration and/or duration of the therapeutic vector could be used.

35

(117)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/2827

PCX05903341

2.8. MODIFIED BACTERIA

Genetically engineered *Salmonella* have been demonstrated to be capable of tumor targeting, possess anti-tumor activity and are useful in delivering effector genes such as the herpes simplex thymidine kinase (HSV TK) to solid tumors (Pawelek et al., WO 96/00218).

2.9. DECREASED INDUCTION OF TNF- α BY MODIFIED BACTERIAL LIPID A

Modifications to the lipid composition of tumor-targeted bacteria which alter the immune response as a result of decreased induction of TNF α production were suggested by Pawelek et al. (Pawelek et al., WO 96/00235). Pawelek et al. provided vaccines for isolation of genes from *Shigella flexneri* for mannosphosphoryl Lipid A (mSLA) production. mSLA acts as an adjuvant to mycobacterial. Pawelek et al. also suggested the use of genetic modifications in the Lipid A biosynthetic pathway, including the mutation *fabD*, which codes for the third enzyme UDP-3-O (R)-3D hydroxymyristoyl-phosphatidate-acyltransferase in Lipid A biosynthesis (Kellay et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:14265-14274). Pawelek et al. showed that mutations in the *fabD* gene induce lower levels of TNF α .

In *Escherichia coli*, the gene *mshB* (m) which is responsible for the terminal phosphorylation of Lipid A has been identified (Engel, et al., 1992, J. Bacteriol. 174:6394-6403; Kozov and Georgopoulos 1992, J. Bacteriol. 174:792-796; Sonnevile et al., 1995, J. Clin. Invest. 97:359-363). Genetic disruption of this gene results in a synthetic condition mutation which blocks TNF α induction (Sonneville et al., 1995, J. Clin. Invest. 97:359-363; Sonnevile, WO 97/25961). These reductions, however, do not suggest that disruption of the *mshB* gene in tumor-targeted *Salmonella* vectors would result in bacteria which are less virulent and more sensitive to chemotherapy agents.

The problems associated with the use of bacteria as gene delivery vectors center on the general ability of bacteria to directly kill normal mammalian cells as well as their ability to overstimulate the immune system via TNF α which can have toxic consequences for the host (Bose, 1992, JAMA 269:3432-3435; and DiCorleto et al., 1993, JAMA 269:1829-1835). In addition to these factors, resistance to antibiotics can severely complicate coping with the presence of bacteria within the human body (Tachape, 1996, D. I. W. Dutch Tumor Workshop 1996 10:273-7; Reeves et al., 1996, Eastern Soc. Microbiol. Clin. 14: 1-3-51).

Huie and Powell, WO92/13837 ("Huie and Powell"), disclose methods to produce gram-negative bacteria having overexpressed Lipid A or LPS.

Moskell, WO93/33923, describes a mutant strain of *Salmonella* having a mutation in the *mshB* gene which reduces TNF α at a lower level as compared to a wild type strain.

6079058012141

5

Citation or identification of any reference in Section 2, or any portion of this application shall not be construed as an admission that such reference is available as prior art to the present invention.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

10 The present invention provides methods for delivering one or more primary effector molecule(s) to a solid tumor. In an embodiment, the methods provide for delivery of a high level of one or more primary effector molecules. In particular, the invention provides methods by which a primary effector molecule(s), which may be toxic or induce unwanted effects (e.g., unwanted immunological effects) when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumor by an attenuated non-oncogenic bacteria, such as *Salmonella* with reduced virulence to the host. The present invention encompasses the preparation and the use of attenuated tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s), to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention are shuttle vectors or bacteriophage derivatives which are engineered to encode one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

The present invention provides a method of tumor-targeted bacteria engineered to express multiple and independent encoding primary effector molecules at the site of a solid tumor. In a specific embodiment, autologous tumor-injected bacteria are engineered to express a single and molecule encoding a primary effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-injected bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. In accordance with this embodiment, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules at the site of a solid tumor. In another embodiment, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strains is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. In a mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains of the same species. In another mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Bacteroides* and *Salmonella*).

(119)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/53877

CCTV05002204

The primary effector molecules of the invention are useful for the treatment of a solid tumor cancer such as a carcinoma, sarcoma, lymphoma, or leukemia. As used herein, "treatment of a solid tumor" or "treat a solid tumor" encompasses inhibiting the growth of a tumor or tumor cells, reducing the volume of a tumor, killing tumor cells, or spreading of tumor cells (metastasis). In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention induce a local immune response at the site of the tumor that results in the inhibition of growth of a tumor or tumor cells, the killing of tumor cells, or the prevention of the spread of tumor cells to other parts of the body. Accordingly, the primary effector molecules provide a therapeutic effect for treatment of a tumor.

The primary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protozoa, or viruses. In a preferred mode of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a mammal. In a more preferred mode of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a human. The primary effector molecules of the invention include members of the TNF family, anti-apoptotic factors, cytotoxic polypeptides or peptides, tumor inhibitory enzymes, and functional fragments thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, including, but not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related cysteine-induced cytotoxic (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α (lymphotestosterone alpha), LT- β (lymphotestosterone beta), OX40L (OX40 ligand), FasL, CD30L (CD30 ligand), CD30L (CD30 ligand), 4-1 BBL, APRIL (a proliferation-inducing ligand), LIGHT (a 19 kDa type II transmembrane protein produced by activated T cells), TL1 (a tumor necrosis factor-like cytotoxic), TNFSF16, TNFSF17, and AITR-L (ligand of the activation-inducible TNF family member). In a preferred embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related cysteine-induced cytotoxic (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), and CD40 ligand (CD40L), or a functional fragment thereof.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are anti-apoptotic factors or functional fragments thereof. Examples of anti-apoptotic factors, including, but not limited to, endostatin, angiotensin, angiotensin, anti-apoptotic antibodies CD, the 29 kDa M-1-related and a 49 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a uPA receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of prothrombin, the 7.8 kDa proteolytic fragment of plasminogen, the anti-apoptotic 24 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-apoptotic factor designated L1-20, the anti-

(120)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/5287

PC5005013242

and/or any 22 amino acid peptide fragment of fibronectin, and/or any 20 amino acid peptide fragment of SPARC, ESD and MSCD containing peptides, the small anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and BGF, and peptide antagonists of integrin $\alpha_5\beta_1$ and the VEGF receptor. In a preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a functional fragment of endostatin, apoligomer or fibronectinogen 1.

In another specific embodiment, the primary effector molecule of the invention are cytotoxic polypeptides or peptides, or functional fragments thereof. Examples of cytotoxic polypeptides or peptides include, but are not limited to, members of the bicyclic family, verotoxin, cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1), cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2), *Escherichia coli* toxin (EET), *Staphylococcus aureus* toxin, hemolysin, CAAX tetrapeptides which are potent competitive inhibitors of tumor necrosis factor, cyclic peptides, Raf kinase inhibitors, PLC kinase inhibitors, caspases, p33, p16, and p21. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is a member of the bacteriocin family, with the proviso that said bacteriocin family member is not a bacteriocin release protein (BRP). Examples of bacteriocin family members include, but are not limited to, ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin B, Colicin C, Colicin D, Colicin E, Colicin F, Colicin G, Colicin H, Colicin I, Colicin J, Colicin K, Colicin L, Colicin M, Colicin N, Colicin O, Colicin P, Colicin Q, Colicin R, Colicin S, Colicin T, Colicin U, Colicin V, Colicin W, Colicin X, Colicin Y, Colicin Z, Colicin AA, Colicin AB, Colicin AC, Colicin AD, Colicin AE, Colicin AF, Colicin AG, Colicin AH, Colicin AI, Colicin AJ, Colicin AK, Colicin AL, Colicin AM, Colicin AN, Colicin AO, Colicin AP, Colicin AQ, Colicin AR, Colicin AS, Colicin AT, Colicin AU, Colicin AV, Colicin AW, Colicin AX, Colicin AY, Colicin AZ, Colicin BA, Colicin BB, Colicin BC, Colicin BD, Colicin BE, Colicin BF, Colicin BG, Colicin BH, Colicin BI, Colicin BJ, Colicin BK, Colicin BL, Colicin BM, Colicin BN, Colicin BO, Colicin BP, Colicin BQ, Colicin BR, Colicin BS, Colicin BT, Colicin BU, Colicin BV, Colicin BW, Colicin BX, Colicin BY, Colicin BZ, Colicin CA, Colicin CB, Colicin CC, Colicin CD, Colicin CE, Colicin CF, Colicin CG, Colicin CH, Colicin CI, Colicin CJ, Colicin CK, Colicin CL, Colicin CM, Colicin CN, Colicin CO, Colicin CP, Colicin CQ, Colicin CR, Colicin CS, Colicin CT, Colicin CU, Colicin CV, Colicin CW, Colicin CX, Colicin CY, Colicin CZ, Colicin DA, Colicin DB, Colicin DC, Colicin DD, Colicin DE, Colicin DF, Colicin DG, Colicin DH, Colicin DI, Colicin DJ, Colicin DK, Colicin DL, Colicin DM, Colicin DN, Colicin DO, Colicin DP, Colicin DQ, Colicin DR, Colicin DS, Colicin DT, Colicin DU, Colicin DV, Colicin DW, Colicin DX, Colicin DY, Colicin DZ, Colicin EA, Colicin EB, Colicin EC, Colicin ED, Colicin EE, Colicin EF, Colicin EG, Colicin EH, Colicin EI, Colicin EJ, Colicin EK, Colicin EL, Colicin EM, Colicin EN, Colicin EO, Colicin EP, Colicin EQ, Colicin ER, Colicin ES, Colicin ET, Colicin EU, Colicin EV, Colicin EW, Colicin EX, Colicin EY, Colicin EZ, Colicin FA, Colicin FB, Colicin FC, Colicin FD, Colicin FE, Colicin FF, Colicin FG, Colicin FH, Colicin FI, Colicin FJ, Colicin FK, Colicin FL, Colicin FM, Colicin FN, Colicin FO, Colicin FP, Colicin FQ, Colicin FR, Colicin FS, Colicin FT, Colicin FU, Colicin FV, Colicin FW, Colicin FX, Colicin FY, Colicin FZ, Colicin GA, Colicin GB, Colicin GC, Colicin GD, Colicin GE, Colicin GF, Colicin GG, Colicin GH, Colicin GI, Colicin GJ, Colicin GK, Colicin GL, Colicin GM, Colicin GN, Colicin GO, Colicin GP, Colicin GQ, Colicin GR, Colicin GS, Colicin GT, Colicin GU, Colicin GV, Colicin GW, Colicin GX, Colicin GY, Colicin GZ, Colicin HA, Colicin HB, Colicin HC, Colicin HD, Colicin HE, Colicin HF, Colicin HG, Colicin HH, Colicin HI, Colicin HJ, Colicin HK, Colicin HL, Colicin HM, Colicin HN, Colicin HO, Colicin HP, Colicin HQ, Colicin HR, Colicin HS, Colicin HT, Colicin HU, Colicin HV, Colicin HW, Colicin HX, Colicin HY, Colicin HZ, Colicin IA, Colicin IB, Colicin IC, Colicin ID, Colicin IE, Colicin IF, Colicin IG, Colicin IH, Colicin II, Colicin IJ, Colicin IK, Colicin IL, Colicin IM, Colicin IN, Colicin IO, Colicin IP, Colicin IQ, Colicin IR, Colicin IS, Colicin IT, Colicin IU, Colicin IV, Colicin IW, Colicin IX, Colicin IY, Colicin IZ, Colicin JA, Colicin JB, Colicin JC, Colicin JD, Colicin JE, Colicin JF, Colicin JG, Colicin JH, Colicin JI, Colicin JJ, Colicin JK, Colicin JL, Colicin JM, Colicin JN, Colicin JO, Colicin JP, Colicin JQ, Colicin JR, Colicin JS, Colicin JT, Colicin JU, Colicin JV, Colicin JW, Colicin JX, Colicin JY, Colicin JZ, Colicin KA, Colicin KB, Colicin KC, Colicin KD, Colicin KE, Colicin KF, Colicin KG, Colicin KH, Colicin KI, Colicin KJ, Colicin KK, Colicin KL, Colicin KM, Colicin KN, Colicin KO, Colicin KP, Colicin KQ, Colicin KR, Colicin KS, Colicin KT, Colicin KU, Colicin KV, Colicin KW, Colicin KX, Colicin KY, Colicin KZ, Colicin LA, Colicin LB, Colicin LC, Colicin LD, Colicin LE, Colicin LF, Colicin LG, Colicin LH, Colicin LI, Colicin LJ, Colicin LK, Colicin LL, Colicin LM, Colicin LN, Colicin LO, Colicin LP, Colicin LQ, Colicin LR, Colicin LS, Colicin LT, Colicin LU, Colicin LV, Colicin LW, Colicin LX, Colicin LY, Colicin LZ, Colicin MA, Colicin MB, Colicin MC, Colicin MD, Colicin ME, Colicin MF, Colicin MG, Colicin MH, Colicin MI, Colicin MJ, Colicin MK, Colicin ML, Colicin MM, Colicin MN, Colicin MO, Colicin MP, Colicin MQ, Colicin MR, Colicin MS, Colicin MT, Colicin MU, Colicin MV, Colicin MW, Colicin MX, Colicin MY, Colicin MZ, Colicin NA, Colicin NB, Colicin NC, Colicin ND, Colicin NE, Colicin NF, Colicin NG, Colicin NH, Colicin NI, Colicin NJ, Colicin NK, Colicin NL, Colicin NM, Colicin NN, Colicin NO, Colicin NP, Colicin NQ, Colicin NR, Colicin NS, Colicin NT, Colicin NU, Colicin NV, Colicin NW, Colicin NX, Colicin NY, Colicin NZ, Colicin OA, Colicin OB, Colicin OC, Colicin OD, Colicin OE, Colicin OF, Colicin OG, Colicin OH, Colicin OI, Colicin OJ, Colicin OK, Colicin OL, Colicin OM, Colicin ON, Colicin OO, Colicin OP, Colicin OQ, Colicin OR, Colicin OS, Colicin OT, Colicin OU, Colicin OV, Colicin OW, Colicin OX, Colicin OY, Colicin OZ, Colicin PA, Colicin PB, Colicin PC, Colicin PD, Colicin PE, Colicin PF, Colicin PG, Colicin PH, Colicin PI, Colicin PJ, Colicin PK, Colicin PL, Colicin PM, Colicin PN, Colicin PO, Colicin PP, Colicin PQ, Colicin PR, Colicin PS, Colicin PT, Colicin PU, Colicin PV, Colicin PW, Colicin PX, Colicin PY, Colicin PZ, Colicin QA, Colicin QB, Colicin QC, Colicin QD, Colicin QE, Colicin QF, Colicin QG, Colicin QH, Colicin QI, Colicin QJ, Colicin QK, Colicin QL, Colicin QM, Colicin QN, Colicin QO, Colicin QP, Colicin QQ, Colicin QR, Colicin QS, Colicin QT, Colicin QU, Colicin QV, Colicin QW, Colicin QX, Colicin QY, Colicin QZ, Colicin RA, Colicin RB, Colicin RC, Colicin RD, Colicin RE, Colicin RF, Colicin RG, Colicin RH, Colicin RI, Colicin RJ, Colicin RK, Colicin RL, Colicin RM, Colicin RN, Colicin RO, Colicin RP, Colicin RQ, Colicin RR, Colicin RS, Colicin RT, Colicin RU, Colicin RV, Colicin RW, Colicin RX, Colicin RY, Colicin RZ, Colicin SA, Colicin SB, Colicin SC, Colicin SD, Colicin SE, Colicin SF, Colicin SG, Colicin SH, Colicin SI, Colicin SJ, Colicin SK, Colicin SL, Colicin SM, Colicin SN, Colicin SO, Colicin SP, Colicin SQ, Colicin SR, Colicin SS, Colicin ST, Colicin SU, Colicin SV, Colicin SW, Colicin SX, Colicin SY, Colicin SZ, Colicin TA, Colicin TB, Colicin TC, Colicin TD, Colicin TE, Colicin TF, Colicin TG, Colicin TH, Colicin TI, Colicin TJ, Colicin TK, Colicin TL, Colicin TM, Colicin TN, Colicin TO, Colicin TP, Colicin TQ, Colicin TR, Colicin TS, Colicin TT, Colicin TU, Colicin TV, Colicin TW, Colicin TX, Colicin TY, Colicin TZ, Colicin UA, Colicin UB, Colicin UC, Colicin UD, Colicin UE, Colicin UF, Colicin UG, Colicin UH, Colicin UI, Colicin UJ, Colicin UK, Colicin UL, Colicin UM, Colicin UN, Colicin UO, Colicin UP, Colicin UQ, Colicin UR, Colicin US, Colicin UT, Colicin UU, Colicin UV, Colicin UW, Colicin UX, Colicin UY, Colicin UZ, Colicin VA, Colicin VB, Colicin VC, Colicin VD, Colicin VE, Colicin VF, Colicin VG, Colicin VH, Colicin VI, Colicin VJ, Colicin VK, Colicin VL, Colicin VM, Colicin VN, Colicin VO, Colicin VP, Colicin VQ, Colicin VR, Colicin VS, Colicin VT, Colicin VU, Colicin VV, Colicin VW, Colicin VX, Colicin VY, Colicin VZ, Colicin WA, Colicin WB, Colicin WC, Colicin WD, Colicin WE, Colicin WF, Colicin WG, Colicin WH, Colicin WI, Colicin WJ, Colicin WK, Colicin WL, Colicin WM, Colicin WN, Colicin WO, Colicin WP, Colicin WQ, Colicin WR, Colicin WS, Colicin WT, Colicin WU, Colicin WV, Colicin WW, Colicin WX, Colicin WY, Colicin WZ, Colicin XA, Colicin XB, Colicin XC, Colicin XD, Colicin XE, Colicin XF, Colicin XG, Colicin XH, Colicin XI, Colicin XJ, Colicin XK, Colicin XL, Colicin XM, Colicin XN, Colicin XO, Colicin XP, Colicin XQ, Colicin XR, Colicin XS, Colicin XT, Colicin XU, Colicin XV, Colicin XW, Colicin XX, Colicin XY, Colicin XZ, Colicin YA, Colicin YB, Colicin YC, Colicin YD, Colicin YE, Colicin YF, Colicin YG, Colicin YH, Colicin YI, Colicin YJ, Colicin YK, Colicin YL, Colicin YM, Colicin YN, Colicin YO, Colicin YP, Colicin YQ, Colicin YR, Colicin YS, Colicin YT, Colicin YU, Colicin YV, Colicin YW, Colicin YX, Colicin YY, Colicin YZ, Colicin ZA, Colicin ZB, Colicin ZC, Colicin ZD, Colicin ZE, Colicin ZF, Colicin ZG, Colicin ZH, Colicin ZI, Colicin ZJ, Colicin ZK, Colicin ZL, Colicin ZM, Colicin ZN, Colicin ZO, Colicin ZP, Colicin ZQ, Colicin ZR, Colicin ZS, Colicin ZT, Colicin ZU, Colicin ZV, Colicin ZW, Colicin ZX, Colicin ZY, Colicin ZZ.

In another specific embodiment, the primary effector molecule of the invention are tumor inhibitory enzymes or functional fragments thereof. Examples of tumor inhibitory enzymes include, but are not limited to, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, ribonuclease (including colicin), DNase, and glycosylase. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is asparaginase.

The present invention also provides methods for local, constitutively delivery of one or more primary effector molecule(s) and one or more secondary effector molecule(s) to solid tumors by intratumoral tumor-injected bacteria, such as *Shigella*. In a specific embodiment, intratumoral tumor-injected bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule and a secondary effector molecule. In another embodiment, intratumoral tumor-injected bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. In a preferred embodiment, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules at the site of a solid tumor. In another embodiment, more than one intratumoral tumor-injected bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules at the site of a

(121)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/23377

C/T058012262

solid tumor. In a mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of the same species. In another mode of this embodiment, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Shistosoma* and *Salmonella*).

The secondary effector molecule(s) of the invention provide additional anti-tumor therapeutic activity, enhance release of the primary effector molecule(s) from the attenuated tumor-targeted bacteria, and/or enhance translocation at the site of action, e.g., at the site of a solid tumor. The secondary effector molecule(s) of the invention comprises a polypeptide (such as an anti-tumor protein, including but not limited to a cytotoxin, an enzyme and a bacteriocin; a pro-drug converting enzyme; an antisense molecule; a phage; an antigen; etc.) which is delivered in addition to the primary effector molecule(s) by the methods of the invention to treat a solid tumor cancer such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma.

The secondary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protists, or viruses. In certain embodiments, the secondary effector molecule is derived from a bacteria or virus. In certain preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a bacterium (e.g., *ShCP*). In other preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a virus (e.g., TAT). In yet other preferred embodiments of the invention, the secondary effector molecule(s) is derived from a mammal. In certain preferred embodiments, the secondary effector molecule(s) is derived from a human.

The invention provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a plasmid or integratable nucleic acid. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. When more than one effector molecule (e.g., primary or secondary) is expressed in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, the effector nucleotides may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid. This invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a nucleic acid which is integrated into the bacterial genome. Integrated effector molecule(s) may be integrated to an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, or may be introduced into the attenuated tumor-targeted bacteria (e.g., by transduction of a suitable self which encodes the effector molecule, such as a plasmid, transfectable nucleic acid, transposon, etc.) such that the nucleic acid encoding the effector molecule becomes integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. The invention provides a nucleic acid construct encoding an effector molecule which nucleic acid is operably linked to an appropriate promoter. A promoter operably linked to a nucleic acid encoding an effector molecule may be heterologous (i.e., native) or heterologous (i.e., not native to the nucleic acid encoding the effector molecule).

(122)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O Duster

CYTOBIOLOGY

Examples of suitable promoters include but are not limited to the T₀ promoter, lac, p_{SP},
 lac, ada, pol II (diaz), ara, recA, wca, wca, wca, wca, wca, wca, wca, wca, wca and
 p_{SP}.

The present invention also provides methods for local delivery of one or more
 fusion proteins comprising a signal sequence and an effector molecule by attenuated
 tumor-targeted bacteria. In a preferred embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are
 5 engineered to express one or more fusion proteins and nucleotides encoding one or more fusion
 proteins comprising an Omp-like protein, or modified thereof (e.g., signal sequence, leader
 sequence, periplasmic region, transmembrane domain, multiple transmembrane domains,
 or combinations thereof; see, e.g., Section 3.1 for definition of "Omp-like protein") and an
 effector molecule. Without intending to be limited as to mechanism, the present invention
 10 discloses that the Omp-like protein acts as an anchor or tether for the effector molecule to the
 outer membrane, or serves to localize the effector molecule to the innermost outer
 membrane. In certain embodiments, the effector molecule has subjected delivery to the
 outer membrane of the bacteria. In one embodiment, the fusion of an effector molecule to
 an Omp-like protein is used to enhance localization of an effector molecule to the
 15 periplasm. In certain other embodiments, the fusion of an effector molecule to an Omp-
 like protein is used to enhance release of the effector molecule. Examples of Omp-like
 proteins include, but are not limited to, at least a portion of each of the following: OmpA,
 OmpB, OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, OmpG, OmpH, OmpI, a porin-like protein, P₁, P₂, P₃, P₄,
 P₅, P₆, P₇, P₈, P₉, P₁₀, P₁₁, P₁₂, P₁₃, P₁₄, P₁₅, P₁₆, P₁₇, P₁₈, P₁₉, P₂₀, P₂₁, P₂₂, P₂₃, P₂₄, P₂₅,
 20 P₂₆, P₂₇, P₂₈, P₂₉, P₃₀, P₃₁, P₃₂, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₃₇, P₃₈, P₃₉, P₄₀, P₄₁, P₄₂, P₄₃, P₄₄, P₄₅,
 P₄₆, P₄₇, P₄₈, P₄₉, P₅₀, P₅₁, P₅₂, P₅₃, P₅₄, P₅₅, P₅₆, P₅₇, P₅₈, P₅₉, P₆₀, P₆₁, P₆₂, P₆₃, P₆₄, P₆₅,
 P₆₆, P₆₇, P₆₈, P₆₉, P₇₀, P₇₁, P₇₂, P₇₃, P₇₄, P₇₅, P₇₆, P₇₇, P₇₈, P₇₉, P₈₀, P₈₁, P₈₂, P₈₃, P₈₄, P₈₅,
 P₈₆, P₈₇, P₈₈, P₈₉, P₉₀, P₉₁, P₉₂, P₉₃, P₉₄, P₉₅, P₉₆, P₉₇, P₉₈, P₉₉, P₁₀₀, P₁₀₁, P₁₀₂, P₁₀₃, P₁₀₄, P₁₀₅,
 P₁₀₆, P₁₀₇, P₁₀₈, P₁₀₉, P₁₁₀, P₁₁₁, P₁₁₂, P₁₁₃, P₁₁₄, P₁₁₅, P₁₁₆, P₁₁₇, P₁₁₈, P₁₁₉, P₁₂₀, P₁₂₁, P₁₂₂, P₁₂₃, P₁₂₄, P₁₂₅,
 P₁₂₆, P₁₂₇, P₁₂₈, P₁₂₉, P₁₃₀, P₁₃₁, P₁₃₂, P₁₃₃, P₁₃₄, P₁₃₅, P₁₃₆, P₁₃₇, P₁₃₈, P₁₃₉, P₁₄₀, P₁₄₁, P₁₄₂, P₁₄₃, P₁₄₄, P₁₄₅,
 P₁₄₆, P₁₄₇, P₁₄₈, P₁₄₉, P₁₅₀, P₁₅₁, P₁₅₂, P₁₅₃, P₁₅₄, P₁₅₅, P₁₅₆, P₁₅₇, P₁₅₈, P₁₅₉, P₁₆₀, P₁₆₁, P₁₆₂, P₁₆₃, P₁₆₄, P₁₆₅,
 P₁₆₆, P₁₆₇, P₁₆₈, P₁₆₉, P₁₇₀, P₁₇₁, P₁₇₂, P₁₇₃, P₁₇₄, P₁₇₅, P₁₇₆, P₁₇₇, P₁₇₈, P₁₇₉, P₁₈₀, P₁₈₁, P₁₈₂, P₁₈₃, P₁₈₄, P₁₈₅,
 P₁₈₆, P₁₈₇, P₁₈₈, P₁₈₉, P₁₉₀, P₁₉₁, P₁₉₂, P₁₉₃, P₁₉₄, P₁₉₅, P₁₉₆, P₁₉₇, P₁₉₈, P₁₉₉, P₂₀₀, P₂₀₁, P₂₀₂, P₂₀₃, P₂₀₄, P₂₀₅,
 P₂₀₆, P₂₀₇, P₂₀₈, P₂₀₉, P₂₁₀, P₂₁₁, P₂₁₂, P₂₁₃, P₂₁₄, P₂₁₅, P₂₁₆, P₂₁₇, P₂₁₈, P₂₁₉, P₂₂₀, P₂₂₁, P₂₂₂, P₂₂₃, P₂₂₄, P₂₂₅,
 P₂₂₆, P₂₂₇, P₂₂₈, P₂₂₉, P₂₃₀, P₂₃₁, P₂₃₂, P₂₃₃, P₂₃₄, P₂₃₅, P₂₃₆, P₂₃₇, P₂₃₈, P₂₃₉, P₂₄₀, P₂₄₁, P₂₄₂, P₂₄₃, P₂₄₄, P₂₄₅,
 P₂₄₆, P₂₄₇, P₂₄₈, P₂₄₉, P₂₅₀, P₂₅₁, P₂₅₂, P₂₅₃, P₂₅₄, P₂₅₅, P₂₅₆, P₂₅₇, P₂₅₈, P₂₅₉, P₂₆₀, P₂₆₁, P₂₆₂, P₂₆₃, P₂₆₄, P₂₆₅,
 P₂₆₆, P₂₆₇, P₂₆₈, P₂₆₉, P₂₇₀, P₂₇₁, P₂₇₂, P₂₇₃, P₂₇₄, P₂₇₅, P₂₇₆, P₂₇₇, P₂₇₈, P₂₇₉, P₂₈₀, P₂₈₁, P₂₈₂, P₂₈₃, P₂₈₄, P₂₈₅,
 P₂₈₆, P₂₈₇, P₂₈₈, P₂₈₉, P₂₉₀, P₂₉₁, P₂₉₂, P₂₉₃, P₂₉₄, P₂₉₅, P₂₉₆, P₂₉₇, P₂₉₈, P₂₉₉, P₃₀₀, P₃₀₁, P₃₀₂, P₃₀₃, P₃₀₄, P₃₀₅,
 P₃₀₆, P₃₀₇, P₃₀₈, P₃₀₉, P₃₁₀, P₃₁₁, P₃₁₂, P₃₁₃, P₃₁₄, P₃₁₅, P₃₁₆, P₃₁₇, P₃₁₈, P₃₁₉, P₃₂₀, P₃₂₁, P₃₂₂, P₃₂₃, P₃₂₄, P₃₂₅,
 P₃₂₆, P₃₂₇, P₃₂₈, P₃₂₉, P₃₃₀, P₃₃₁, P₃₃₂, P₃₃₃, P₃₃₄, P₃₃₅, P₃₃₆, P₃₃₇, P₃₃₈, P₃₃₉, P₃₄₀, P₃₄₁, P₃₄₂, P₃₄₃, P₃₄₄, P₃₄₅,
 P₃₄₆, P₃₄₇, P₃₄₈, P₃₄₉, P₃₅₀, P₃₅₁, P₃₅₂, P₃₅₃, P₃₅₄, P₃₅₅, P₃₅₆, P₃₅₇, P₃₅₈, P₃₅₉, P₃₆₀, P₃₆₁, P₃₆₂, P₃₆₃, P₃₆₄, P₃₆₅,
 P₃₆₆, P₃₆₇, P₃₆₈, P₃₆₉, P₃₇₀, P₃₇₁, P₃₇₂, P₃₇₃, P₃₇₄, P₃₇₅, P₃₇₆, P₃₇₇, P₃₇₈, P₃₇₉, P₃₈₀, P₃₈₁, P₃₈₂, P₃₈₃, P₃₈₄, P₃₈₅,
 P₃₈₆, P₃₈₇, P₃₈₈, P₃₈₉, P₃₉₀, P₃₉₁, P₃₉₂, P₃₉₃, P₃₉₄, P₃₉₅, P₃₉₆, P₃₉₇, P₃₉₈, P₃₉₉, P₄₀₀, P₄₀₁, P₄₀₂, P₄₀₃, P₄₀₄, P₄₀₅,
 P₄₀₆, P₄₀₇, P₄₀₈, P₄₀₉, P₄₁₀, P₄₁₁, P₄₁₂, P₄₁₃, P₄₁₄, P₄₁₅, P₄₁₆, P₄₁₇, P₄₁₈, P₄₁₉, P₄₂₀, P₄₂₁, P₄₂₂, P₄₂₃, P₄₂₄, P₄₂₅,
 P₄₂₆, P₄₂₇, P₄₂₈, P₄₂₉, P₄₃₀, P₄₃₁, P₄₃₂, P₄₃₃, P₄₃₄, P₄₃₅, P₄₃₆, P₄₃₇, P₄₃₈, P₄₃₉, P₄₄₀, P₄₄₁, P₄₄₂, P₄₄₃, P₄₄₄, P₄₄₅,
 P₄₄₆, P₄₄₇, P₄₄₈, P₄₄₉, P₄₅₀, P₄₅₁, P₄₅₂, P₄₅₃, P₄₅₄, P₄₅₅, P₄₅₆, P₄₅₇, P₄₅₈, P₄₅₉, P₄₆₀, P₄₆₁, P₄₆₂, P₄₆₃, P₄₆₄, P₄₆₅,
 P₄₆₆, P₄₆₇, P₄₆₈, P₄₆₉, P₄₇₀, P₄₇₁, P₄₇₂, P₄₇₃, P₄₇₄, P₄₇₅, P₄₇₆, P₄₇₇, P₄₇₈, P₄₇₉, P₄₈₀, P₄₈₁, P₄₈₂, P₄₈₃, P₄₈₄, P₄₈₅,
 P₄₈₆, P₄₈₇, P₄₈₈, P₄₈₉, P₄₉₀, P₄₉₁, P₄₉₂, P₄₉₃, P₄₉₄, P₄₉₅, P₄₉₆, P₄₉₇, P₄₉₈, P₄₉₉, P₅₀₀, P₅₀₁, P₅₀₂, P₅₀₃, P₅₀₄, P₅₀₅,
 P₅₀₆, P₅₀₇, P₅₀₈, P₅₀₉, P₅₁₀, P₅₁₁, P₅₁₂, P₅₁₃, P₅₁₄, P₅₁₅, P₅₁₆, P₅₁₇, P₅₁₈, P₅₁₉, P₅₂₀, P₅₂₁, P₅₂₂, P₅₂₃, P₅₂₄, P₅₂₅,
 P₅₂₆, P₅₂₇, P₅₂₈, P₅₂₉, P₅₃₀, P₅₃₁, P₅₃₂, P₅₃₃, P₅₃₄, P₅₃₅, P₅₃₆, P₅₃₇, P₅₃₈, P₅₃₉, P₅₄₀, P₅₄₁, P₅₄₂, P₅₄₃, P₅₄₄, P₅₄₅,
 P₅₄₆, P₅₄₇, P₅₄₈, P₅₄₉, P₅₅₀, P₅₅₁, P₅₅₂, P₅₅₃, P₅₅₄, P₅₅₅, P₅₅₆, P₅₅₇, P₅₅₈, P₅₅₉, P₅₆₀, P₅₆₁, P₅₆₂, P₅₆₃, P₅₆₄, P₅₆₅,
 P₅₆₆, P₅₆₇, P₅₆₈, P₅₆₉, P₅₇₀, P₅₇₁, P₅₇₂, P₅₇₃, P₅₇₄, P₅₇₅, P₅₇₆, P₅₇₇, P₅₇₈, P₅₇₉, P₅₈₀, P₅₈₁, P₅₈₂, P₅₈₃, P₅₈₄, P₅₈₅,
 P₅₈₆, P₅₈₇, P₅₈₈, P₅₈₉, P₅₉₀, P₅₉₁, P₅₉₂, P₅₉₃, P₅₉₄, P₅₉₅, P₅₉₆, P₅₉₇, P₅₉₈, P₅₉₉, P₆₀₀, P₆₀₁, P₆₀₂, P₆₀₃, P₆₀₄, P₆₀₅,
 P₆₀₆, P₆₀₇, P₆₀₈, P₆₀₉, P₆₁₀, P₆₁₁, P₆₁₂, P₆₁₃, P₆₁₄, P₆₁₅, P₆₁₆, P₆₁₇, P₆₁₈, P₆₁₉, P₆₂₀, P₆₂₁, P₆₂₂, P₆₂₃, P₆₂₄, P₆₂₅,
 P₆₂₆, P₆₂₇, P₆₂₈, P₆₂₉, P₆₃₀, P₆₃₁, P₆₃₂, P₆₃₃, P₆₃₄, P₆₃₅, P₆₃₆, P₆₃₇, P₆₃₈, P₆₃₉, P₆₄₀, P₆₄₁, P₆₄₂, P₆₄₃, P₆₄₄, P₆₄₅,
 P₆₄₆, P₆₄₇, P₆₄₈, P₆₄₉, P₆₅₀, P₆₅₁, P₆₅₂, P₆₅₃, P₆₅₄, P₆₅₅, P₆₅₆, P₆₅₇, P₆₅₈, P₆₅₉, P₆₆₀, P₆₆₁, P₆₆₂, P₆₆₃, P₆₆₄, P₆₆₅,
 P₆₆₆, P₆₆₇, P₆₆₈, P₆₆₉, P₆₇₀, P₆₇₁, P₆₇₂, P₆₇₃, P₆₇₄, P₆₇₅, P₆₇₆, P₆₇₇, P₆₇₈, P₆₇₉, P₆₈₀, P₆₈₁, P₆₈₂, P₆₈₃, P₆₈₄, P₆₈₅,
 P₆₈₆, P₆₈₇, P₆₈₈, P₆₈₉, P₆₉₀, P₆₉₁, P₆₉₂, P₆₉₃, P₆₉₄, P₆₉₅, P₆₉₆, P₆₉₇, P₆₉₈, P₆₉₉, P₇₀₀, P₇₀₁, P₇₀₂, P₇₀₃, P₇₀₄, P₇₀₅,
 P₇₀₆, P₇₀₇, P₇₀₈, P₇₀₉, P₇₁₀, P₇₁₁, P₇₁₂, P₇₁₃, P₇₁₄, P₇₁₅, P₇₁₆, P₇₁₇, P₇₁₈, P₇₁₉, P₇₂₀, P₇₂₁, P₇₂₂, P₇₂₃, P₇₂₄, P₇₂₅,
 P₇₂₆, P₇₂₇, P₇₂₈, P₇₂₉, P₇₃₀, P₇₃₁, P₇₃₂, P₇₃₃, P₇₃₄, P₇₃₅, P₇₃₆, P₇₃₇, P₇₃₈, P₇₃₉, P₇₄₀, P₇₄₁, P₇₄₂, P₇₄₃, P₇₄₄, P₇₄₅,
 P₇₄₆, P₇₄₇, P₇₄₈, P₇₄₉, P₇₅₀, P₇₅₁, P₇₅₂, P₇₅₃, P₇₅₄, P₇₅₅, P₇₅₆, P₇₅₇, P₇₅₈, P₇₅₉, P₇₆₀, P₇₆₁, P₇₆₂, P₇₆₃, P₇₆₄, P₇₆₅,
 P₇₆₆, P₇₆₇, P₇₆₈, P₇₆₉, P₇₇₀, P₇₇₁, P₇₇₂, P₇₇₃, P₇₇₄, P₇₇₅, P₇₇₆, P₇₇₇, P₇₇₈, P₇₇₉, P₇₈₀, P₇₈₁, P₇₈₂, P₇₈₃, P₇₈₄, P₇₈₅,
 P₇₈₆, P₇₈₇, P₇₈₈, P₇₈₉, P₇₉₀, P₇₉₁, P₇₉₂, P₇₉₃, P₇₉₄, P₇₉₅, P₇₉₆, P₇₉₇, P₇₉₈, P₇₉₉, P₈₀₀, P₈₀₁, P₈₀₂, P₈₀₃, P₈₀₄, P₈₀₅,
 P₈₀₆, P₈₀₇, P₈₀₈, P₈₀₉, P₈₁₀, P₈₁₁, P₈₁₂, P₈₁₃, P₈₁₄, P₈₁₅, P₈₁₆, P₈₁₇, P₈₁₈, P₈₁₉, P₈₂₀, P₈₂₁, P₈₂₂, P₈₂₃, P₈₂₄, P₈₂₅,
 P₈₂₆, P₈₂₇, P₈₂₈, P₈₂₉, P₈₃₀, P₈₃₁, P₈₃₂, P₈₃₃, P₈₃₄, P₈₃₅, P₈₃₆, P₈₃₇, P₈₃₈, P₈₃₉, P₈₄₀, P₈₄₁, P₈₄₂, P₈₄₃, P₈₄₄, P₈₄₅,
 P₈₄₆, P₈₄₇, P₈₄₈, P₈₄₉, P₈₅₀, P₈₅₁, P₈₅₂, P₈₅₃, P₈₅₄, P₈₅₅, P₈₅₆, P₈₅₇, P₈₅₈, P₈₅₉, P₈₆₀, P₈₆₁, P₈₆₂, P₈₆₃, P₈₆₄, P₈₆₅,
 P₈₆₆, P₈₆₇, P₈₆₈, P₈₆₉, P₈₇₀, P₈₇₁, P₈₇₂, P₈₇₃, P₈₇₄, P₈₇₅, P₈₇₆, P₈₇₇, P₈₇₈, P₈₇₉, P₈₈₀, P₈₈₁, P₈₈₂, P₈₈₃, P₈₈₄, P₈₈₅,
 P₈₈₆, P₈₈₇, P₈₈₈, P₈₈₉, P₈₉₀, P₈₉₁, P₈₉₂, P₈₉₃, P₈₉₄, P₈₉₅, P₈₉₆, P₈₉₇, P₈₉₈, P₈₉₉, P₉₀₀, P₉₀₁, P₉₀₂, P₉₀₃, P₉₀₄, P₉₀₅,
 P₉₀₆, P₉₀₇, P₉₀₈, P₉₀₉, P₉₁₀, P₉₁₁, P₉₁₂, P₉₁₃, P₉₁₄, P₉₁₅, P₉₁₆, P₉₁₇, P₉₁₈, P₉₁₉, P₉₂₀, P₉₂₁, P₉₂₂, P₉₂₃, P₉₂₄, P₉₂₅,
 P₉₂₆, P₉₂₇, P₉₂₈, P₉₂₉, P₉₃₀, P₉₃₁, P₉₃₂, P₉₃₃, P₉₃₄, P₉₃₅, P₉₃₆, P₉₃₇, P₉₃₈, P₉₃₉, P₉₄₀, P₉₄₁, P₉₄₂, P₉₄₃, P₉₄₄, P₉₄₅,
 P₉₄₆, P₉₄₇, P₉₄₈, P₉₄₉, P₉₅₀, P₉₅₁, P₉₅₂, P₉₅₃, P₉₅₄, P₉₅₅, P₉₅₆, P₉₅₇, P₉₅₈, P₉₅₉, P₉₆₀, P₉₆₁, P₉₆₂, P₉₆₃, P₉₆₄, P₉₆₅,
 P₉₆₆, P₉₆₇, P₉₆₈, P₉₆₉, P₉₇₀, P₉₇₁, P₉₇₂, P₉₇₃, P₉₇₄, P₉₇₅, P₉₇₆, P₉₇₇, P₉₇₈, P₉₇₉, P₉₈₀, P₉₈₁, P₉₈₂, P₉₈₃, P₉₈₄, P₉₈₅,
 P₉₈₆, P₉₈₇, P₉₈₈, P₉₈₉, P₉₉₀, P₉₉₁, P₉₉₂, P₉₉₃, P₉₉₄, P₉₉₅, P₉₉₆, P₉₉₇, P₉₉₈, P₉₉₉, P₁₀₀₀, P₁₀₀₁, P₁₀₀₂, P₁₀₀₃, P₁₀₀₄, P₁₀₀₅,
 P₁₀₀₆, P₁₀₀₇, P₁₀₀₈, P₁₀₀₉, P₁₀₁₀, P₁₀₁₁, P₁₀₁₂, P₁₀₁₃, P₁₀₁₄, P₁₀₁₅, P₁₀₁₆, P₁₀₁₇, P₁₀₁₈, P₁₀₁₉, P₁₀₂₀, P₁₀₂₁, P₁₀₂₂, P₁₀₂₃, P₁₀₂₄, P₁₀₂₅,
 P₁₀₂₆, P₁₀₂₇, P₁₀₂₈, P₁₀₂₉, P₁₀₃₀, P₁₀₃₁, P₁₀₃₂, P₁₀₃₃, P₁₀₃₄, P₁₀₃₅, P₁₀₃₆, P₁₀₃₇, P₁₀₃₈, P₁₀₃₉, P₁₀₄₀, P₁₀₄₁, P₁₀₄₂, P₁₀₄₃, P₁₀₄₄, P₁₀₄₅,
 P₁₀₄₆, P₁₀₄₇, P₁₀₄₈, P₁₀₄₉, P₁₀₅₀, P₁₀₅₁, P₁₀₅₂, P₁₀₅₃, P₁₀₅₄, P₁₀₅₅, P₁₀₅₆, P₁₀₅₇, P₁₀₅₈, P₁₀₅₉, P₁₀₆₀, P₁₀₆₁, P₁₀₆₂, P₁₀₆₃, P₁₀₆₄, P₁₀₆₅,
 P₁₀₆₆, P₁₀₆₇, P₁₀₆₈, P₁₀₆₉, P₁₀₇₀, P₁₀₇₁, P₁₀₇₂, P₁₀₇₃, P₁₀₇₄, P₁₀₇₅, P₁₀₇₆, P₁₀₇₇, P₁₀₇₈, P₁₀₇₉, P₁₀₈₀, P₁₀₈₁, P₁₀₈₂, P₁₀₈₃, P₁₀₈₄, P₁₀₈₅,
 P₁₀₈₆, P₁₀₈₇, P₁₀₈₈, P₁₀₈₉, P₁₀₉₀, P₁₀₉₁, P₁₀₉₂, P₁₀₉₃, P₁₀₉₄, P₁₀₉₅, P₁₀₉₆, P₁₀₉₇, P₁₀₉₈, P₁₀₉₉, P₁₁₀₀, P₁₁₀₁, P₁₁₀₂, P₁₁₀₃, P₁₁₀₄, P₁₁₀₅,
 P₁₁₀₆, P₁₁₀₇, P₁₁₀₈, P₁₁₀₉, P₁₁₁₀, P₁₁₁₁, P₁₁₁₂, P₁₁₁₃, P₁₁₁₄, P₁₁₁₅, P₁₁₁₆, P₁₁₁₇, P₁₁₁₈, P₁₁₁₉, P₁₁₂₀, P₁₁₂₁, P₁₁₂₂, P₁₁₂₃, P₁₁₂₄, P₁₁₂₅,
 P₁₁₂₆, P₁₁₂₇, P₁₁₂₈, P₁₁₂₉, P₁₁₃₀, P₁₁₃₁, P₁₁₃₂, P₁

(123)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PCT/US00/00000

engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with these embodiments, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule. Examples of fatty peptides include, but are not limited to, peptides derived from the HIV TAT protein, the streptococcal homophilin (genomulin), Kaposi's sarcoma growth factor (KGF) membrane-translocating sequence (MTS), and herpes simplex virus VP22.

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a signal peptide, fatty peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a fatty peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a proteolytic cleavage site, a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

In certain embodiments, a single bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding a fusion protein of the invention at the site of a solid tumor. In certain other embodiments, more than one attenuated tumor-targeted bacterial strain is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention at the site of a solid tumor. In many of these embodiments, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of the same species. In particular modes of these embodiments, the attenuated tumor-targeted bacterial strains are of different species (e.g., *Listeria* and *Salmonella*).

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules of the invention to the site of a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. Preferably, the expression of both the fusion protein(s) and effector molecule(s) at the site of the solid tumor by an attenuated tumor-targeted bacteria improves the level of tumor or tumor cell growth inhibited compared to when either fusion protein(s) alone or the effector molecule(s) alone is expressed.

The present invention also provides expression of a primary effector molecule and optionally, a secondary effector molecule in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, which bacteria has an enhanced release system. In a preferred embodiment of

(124)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

WO 01/2527

PCV058012262

the invention, the enhanced release is associated with expression of a release factor by the attenuated tumor-targeted bacteria. In one embodiment, the release allows enhanced release of effector molecules from the cytoplasmic or periplasmic space. A release factor may be endogenous to the attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (i.e., encoded by a nucleic acid molecule that is not native to the attenuated tumor-targeted bacteria). A release factor may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In a preferred embodiment, the release factor is a Bacteriocin Release Protein (BRP). In a specific embodiment, the BRP is that of the cloacin DF13 plasmid, that of colicin E1-E9 plasmids, or the colicin A, B or D plasmids. In a preferred embodiment, the BRP is of cloacin DF13 (pColDF13 BRP). In another embodiment of the invention, the enhanced release system comprises overexpression of a fusion protein.

The present invention also provides expression of a fusion protein of the invention in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*, which bacteria has an enhanced release system. In a specific embodiment, the release factor is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising a primary effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the release factor allows for enhanced release of the fusion protein from the periplasmic space.

In one embodiment, the present invention provides methods of delivering high levels of effector molecules or fusion proteins using modified, attenuated tumor-targeted strains of bacteria, which selectively accumulate within tumors while expressing the effector molecules or fusion proteins. In a specific mode, a modified, attenuated tumor-targeted strain of bacteria selectively amplifies effector molecules within tumors. While the workings of the following systems are discussed, for simplicity, with reference specifically to *Salmonella*, the compositions and methods of the invention are in no way meant to be restricted to *Salmonella* but encompass any other bacteria to which the teachings apply. Specifically, the invention provides an attenuated tumor-targeted bacterium which is a facultative aerobic or facultative anaerobe. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria include, but are not limited to, *Escherichia coli*, including enterovirulent *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Hepatitis* spp., and *Streptococcus* spp.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector

(125)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/01287

PCY0000000000

molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated (tumor-targeted) bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules (i.e., primary effector, secondary molecules). In a preferred embodiment, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.

The pharmaceutical compositions of the invention are useful for the treatment of solid tumors. Solid tumors include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas, lymphomas, and other solid tumor cancers, including, but not limited to brain tumors, tumors of the central nervous system, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, astrocytoma, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, melanoma, renal cancer, bladder cancer, and neuroendocrine.

The present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. The present invention also provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention. Further, the present invention provides methods for delivering a primary effector molecule for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in need of such treatment, a pharmaceutical composition

- 18 -

(126)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SUMMARY

BACKGROUND

comprising an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules (i.e., primary or/and secondary molecules). In a preferred embodiment, the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*. In a specific mode, the attenuated tumor-targeted bacteria comprises an antitumor release system.

In certain embodiments, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with other known cancer therapies. For example, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with chemotherapeutic agents. Examples of chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, irinotecan, paclitaxel, topotecan, topoisomerase I inhibitors (e.g., CPT-11), irinotecan, 9-AC, and GG-211, gemtuzumab, vincristine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, vinorelbine, tamoxifen, azoxystyrene, granulocyte colony-stimulating factor, cyclophosphamide, etoposide, vincristine, vincristine, colchicine, doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, anthracycline, mitomycin, and other cytotoxic agents. Alternatively, attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins can be used in conjunction with radiation therapy.

The present invention includes the sequential or concomitant administration of anticancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins. The invention encompasses combinations of anticancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of anti-cancer agents and attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that have different sites of action. Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these therapies whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

3.1. DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

As used herein, *Salmonella* encompasses all *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, and *Salmonella enteritidis*. Subtypes of

(127)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/23491

CCTV0000000000

Schistosoma are also encompassed herein, for example, *Schistosoma*, a subgroup of *Schistosoma* spp., commonly referred to as *Schistosoma* spp.

Analogs: As used herein, the term "analog" refers to a polypeptide that possesses a similar or identical function as a primary or secondary effector molecule but does not necessarily comprise a similar or identical amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule, or possess a similar or identical structure of a primary or secondary effector molecule. A polypeptide that has a similar amino acid sequence refers to a polypeptide that satisfies at least one of the following: (a) a polypeptide having an amino acid sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99% identical to the amino acid sequence of a primary or secondary effector molecule described herein; (b) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to a nucleotide sequence encoding a primary or secondary effector molecule described herein of at least 3 contiguous amino acid residues, at least 10 contiguous amino acid residues, at least 15 contiguous amino acid residues, at least 20 contiguous amino acid residues, at least 25 contiguous amino acid residues, at least 40 contiguous amino acid residues, at least 50 contiguous amino acid residues, at least 60 contiguous amino acid residues, at least 70 contiguous amino acid residues, at least 80 contiguous amino acid residues, at least 90 contiguous amino acid residues, at least 100 contiguous amino acid residues, at least 125 contiguous amino acid residues, or at least 150 contiguous amino acid residues; and (c) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that is at least 36%, at least 39%, at least 42%, at least 45%, at least 48%, at least 53%, at least 60%, at least 67%, at least 74%, at least 79%, at least 84%, at least 89%, at least 94%, at least 95% or at least 99% identical to the nucleotide sequence encoding a primary or secondary effector molecule described herein. A polypeptide with similar structure to a primary or secondary effector molecule described herein refers to a polypeptide that has a similar secondary, tertiary or quaternary structure of primary or secondary effector molecule described herein. The structure of a polypeptide can be determined by methods known to those skilled in the art, including but not limited to, peptide sequencing, X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and crystallography of electron microscopy.

Anti-angiogenic factor: An anti-angiogenic factor is any protein or molecule which has anti-angiogenic activity, or a molecule encoding such a protein or molecule. In a preferred embodiment, the anti-angiogenic factor is a peptide fragment or cleavage fragment of a larger protein.

Attenuation: Attenuation is a modification so that a microorganism or vector is less pathogenic. The end result of attenuation is that the risk of toxicity as well as other side-effects is decreased, when the microorganism or vector is administered to the patient.

PC 94150001263

5

4

1

25 "Alternative" in the context of a "Disruptive Action" means and encompasses "Strategic Disruption" referred to in a modified manner. Subsequent means as defined in International Publication No. WO 99/13053 at page 17, incorporated herein by reference in its entirety.

Fragment: As used herein, the term "fragment" refers to a peptide or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 2 contiguous amino acids and residues, or at least 5 contiguous amino acids (residues), or at least 10 contiguous amino acids and residues, or at least 15 contiguous amino acids and residues, or at least 20 contiguous amino acids and residues, or at least 25 contiguous amino acids and residues, or at least 30 contiguous amino acids and residues, or at least 35 contiguous amino acids and residues, or at least 40 contiguous amino acids and residues, or at least 45 contiguous amino acids and residues, or at least 50 contiguous amino acids and residues, or at least 60 contiguous amino acids and residues, or at least 70 contiguous amino acids and residues, or at least 80 contiguous amino acids and residues, or at least 90 contiguous amino acids and residues, or at least 100 contiguous amino acids and residues, or at least 125 amino acid residues, or at least 150 contiguous amino acids and residues, or at least

09/05/2017 13:47

§

10

15

21

25

30

35

Tumor-targeted: Tumor-targeted is defined as the ability to preferentially localize to a cancerous target cell or tissue relative to a non-cancerous counterpart cell or tissue and replicate. Thus, a tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* preferentially attaches to, infects and/or replicates viable in the cancerous target cell or the tumor environment.

(130)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/5389

PCT/US00/03894

Virulence: Virulence is a relative term describing the general ability to cause disease, including the ability to kill normal cells or the ability to elicit septic shock (see specific definitions below).

As used herein, the strain designations VNF20009 (International Publication No. WO 99/12053), VSI546 and 8.7 are used interchangeably and each refers to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned Accession No. 202165. As used herein, the strain designations VSI546 and 8.7 are used interchangeably and each refers to the strain deposited with the American Type Culture Collection and assigned Accession No. 202164.

The present invention may be understood more fully by reference to the following detailed description, illustrative examples of specific embodiments and the appended figures.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1. Coding sequence for the mature human TNF- α . Both DNA (SEQ ID NO:3) and protein (SEQ ID NO:4) sequences are indicated.

FIG. 2. Derivation of the *Salmonella* VNF20009 *gcrC* strain.

FIG. 3. TNF- α expression from a chromosomally integrated *gcrC* promoter drives TNF- α genes in *Salmonella typhimurium*.

FIG. 4. Coding sequence for the synthetic CampA signal sequence (nucleotides 1-63) fused to the mature human TNF- α (nucleotides 67-543). Both DNA (SEQ ID NO:7) and protein (SEQ ID NO:8) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 5. Periplasmic localization and processing of an CampA/TNF- α fusion protein in Bock (J04109 strain).

FIG. 6. Coding sequence for the CampA signal sequence (nucleotides 1-63) fused to the mature human TRAIL (nucleotides 67-881). Both DNA (SEQ ID NO:9) and protein (SEQ ID NO:10) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 7. Expression and processing of an CampA/TRAIL fusion protein in Bock (J04109 strain).

(131)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/03899

PCXAE600000000

FIG. 8. Coding sequence for the modified OmpA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature (C125A) human IL-2 (nucleotides 64-462). Both OmpA (SEQ ID NO:11) and protein (SEQ ID NO:12) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 9. Expression and processing of recombinant human IL-2 fused to the pOmpA(8L) or ompA(8L) synthetic signal peptides.

FIG. 10. Coding sequence for the modified pOmpA signal sequence (nucleotides 1-63) fusion to the mature (C125A) human IL-2 (nucleotides 64-462). Both OmpA (SEQ ID NO:13) and protein (SEQ ID NO:14) sequences are indicated for the fusion construct.

FIG. 11. *In vivo* anti-tumor efficacy of an attenuated strain of *Salmonella typhimurium* expressing the mature form of human TNF- α .

FIG. 12. Effect of BLP expression on anti-tumor efficacy *in vivo*. The figure shows a graphic representation of tumor size over time of a C57BL/6 mouse population with B16 melanoma tumors treated with (1) a PBS control; (2) VNP20009; and (3) VNP20009 harboring the pSV1 plasmid, which comprises the BLP gene.

FIG. 13. Anomalous induction of β -gal gene expression under the control of the p_{galT} promoter in *Salmonella*. FIG. 13A demonstrates the *in vitro* induction of β -gal expression in response to anhydrous conditions of two strains of *Salmonella*, TS1456 and VNP20009. FIG. 13B demonstrates the *in vivo* induction of β -gal in tumor *v. vivo* cells of VNP20009 *Salmonella* expressing BLP, β -gal, or BLP and β -gal.

FIG. 14. Tetracycline induction of β -gal gene expression under the control of the Tet promoter in *Salmonella*. The dose-response indicates a linear response to Tetracycline up to a concentration of approximately 0.15 μ g/ml, after which there response declines, presumably as a result of the antibiotic function of Tetracycline.

FIG. 15. Hexaplasidine-inducible (HexaHIS-endonuclease) expression from the pTet90a vector. FIG. 15A shows the expression of HexaHIS-endonuclease from three independent clones transformed into *Salmonella* (VNP20009). FIG. 15B shows the expression of HexaHIS-endonuclease from five independent clones transformed into *E. coli* (DE4). Even numbered lanes indicate extracts from uninduced cultures, whereas odd numbered lanes indicate the corresponding IPTG-induced cultures.

FIG. 16. Regression of HexaHIS-endonuclease from the plasmid YA3334.

- 24 -

(132)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 01/15/07

PC 000000000000

Human HIF-1 α endonuclease (HIF-1 α nuclease) is able to express a band of the correct size for HIF-1 α endonuclease (~21kD) by Western analysis with a anti-HIF-1 α antibody (lanes 1-3 correspond to eight independent clones).

FIG. 17. Efficacy of VNP20009 cells expressing endonuclease on C3H mouse colon carcinoma. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of a mouse population with established C3H tumors treated with (1) a PBS control; (2) and VNP20009 carrying an empty YAS334 vector; and (3) VNP20009 which expresses human HIF-1 α endonuclease; (4) and VNP20009 which expresses human HIF-1 α endonuclease and BFP.

FIG. 18. Efficacy of VNP20009 cells expressing endonuclease on DLD1 human colon carcinoma. The figure shows a graphic representation of mean tumor size over time of a mouse population with established DLD1 tumors treated with (1) a PBS control; (2) and VNP20009 carrying an empty YAS334 vector; and (3) VNP20009 which expresses human HIF-1 α endonuclease and BFP.

FIG. 19. Anti-proliferative activity of lysates from attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing human endonuclease on endothelial cells. This figure shows the inhibition of human vein endothelial cell (HUEVC) proliferation in response to bFGF and lysates corresponding to 5×10^6 bacteria. As a control *Salmonella* containing the empty pTet vector was used. Each data point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Samples were normalized by the number of bacteria.

FIG. 20. Anti-proliferative activity of lysates from attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing platelet factor-4 peptide (amino acids 47-79 of platelet factor-4) and thrombospondin peptide (13-47) on endothelial cells. This figure shows the inhibition of human vein endothelial cell (HUEVC) proliferation in response to bFGF and lysates corresponding to 3.3×10^6 bacteria. As a control *Salmonella* containing the empty pTet vector was used. Each data point is a mean of quadruplicate values from a representative experiment. Samples were normalized by the number of bacteria.

FIG. 21. Construction of the pTet-shuttle-1 Vector.

FIG. 22. Construction of the Col E3-CAS3 Vector (GenBank Accession Number AF129270). The nucleotide sequence of the Col E3-CAS3 Vector is as depicted in SEQ ID NO: 1. The Col E3-CAS3 Vector contains 5 open reading frames as depicted in SEQ ID Nos 2-5, respectively.

- 35 -

(133)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 03/08879

PCT/JP03/03341

FIG. 23. Construction of the Col E3-CADHERIN-1 vector.

FIG. 24. Bar Graph showing the amount of secreted units of colicin E3 produced by each strain.

FIG. 25. Plate assay for various strains exposed to ultraviolet light or X-rays.

FIG. 26. Efficacy of 41.2.94Col E3 on C3H murine colon carcinoma.

FIG. 27. Anti-tumor activity of 41.2.94Col E3 on DLD-1 human colon carcinoma in NU/NU mice.

FIG. 28. Efficacy of 41.2.94Col E3 on B16 murine melanoma.

FIG. 29. Cytotoxicity of *Serratia* expressing cloned E. coli CNFL.

FIG. 30. Fibro cells exposed to CNFL (A) show enlargement and nucleolus changes relative to normal fibro cells (B).

FIG. 31. The *neoB* portion of the pCYD442-*neoB* vector in the 3' to 5' orientation (as viewed in FIG. 32 map), with a deletion in the middle of *neoB* and containing internal *NotI*, *PacI*, *SphI*, *BstI*, *SmaI* and *DraI* polylinker in its place (SEQ ID NO 61). See FIG. 32.FIG. 32. Restriction map and schematic of the pCYD442-*neoB* vector for cloning DNA in the *Drosophila* region and subsequent insertion on the chromosome. *neoB* (1), the 5' and 3' regions of *neoB*; *neoB* 3P4, the mobilization element in order for the plasmid to be transferred from one strain to another. *bla*, the beta-lactamase gene which confers sensitivity to beta-lactam antibiotics such as carbenicillin and ampicillin. *catB*, the gene which confers sensitivity to tetracycline.FIG. 33. 1) pCYD442-Tu-ERP-A3 vector, 2) homologous recombination with the *Drosophila* chromosomal copy in *Salmonella* Y350102, 3) chromosomal integration in *Salmonella* Y350102, and following phage transduction to strain VNP20000, 4) successful replication resulting in stable At.30-Tu-ERP-A3. *oriDAX*, the plasmid origin of replication; *mobP4*, the mobilization element in order for the plasmid to be transferred from one strain to another. *amp^r*, the beta-lactamase gene which confers sensitivity to beta-lactam antibiotics.

(134)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/28877

PCT/JP00/013242

to; but sensitive such as carbimide, and camptothecin. *etc.*, the genes which confer sensitivity to aromatic. Note: not drawn to scale.

FIG. 34. Percent cytotoxicity of tetracycline (TET) and doxycycline (DOX) compared to positive and negative controls (HSC10 and 41.2.9) following 72 hours of exposure to BSCV3 cells (Ave N=3). Repression of vesicular was induced by tetracycline (TET) clones 26 and 34). Tetracycline treatment (+) and no tetracycline treatment (-). The H. coli strain HSC10 was used as a positive control for percent cytotoxicity.

FIG. 35. Halo formation on blood agar for attenuated *Salmonella* in the absence of tetracycline (TA) and the presence of tetracycline (TB). Halo formation for attenuated *Salmonella* engineered to constitutively express *ShdA* in the absence of tetracycline (2A) and the presence of tetracycline (2B). Halo formation for attenuated *Salmonella* engineered to express tetracycline inducible *ShdA* in the absence of tetracycline (3A) and the presence of tetracycline (3B).

FIG. 36. (A) An illustration of the TAT- α -galactosyl transferase protein without the histidine tag. (B) An illustration of the TAT- α -galactosyl transferase protein with the histidine tag. (C) An illustration of the TAT- α -galactosyl transferase protein with an OmpA-SL signal sequence.

FIG. 37. Coding sequence for TAT- α -galactosyl transferase protein. Both DNA (SEQ ID NO:57) and protein (SEQ ID NO:58) sequences are indicated.

FIG. 38. Coding sequence for histidine-TAT- α -galactosyl transferase protein. Both DNA (SEQ ID NO:59) and protein (SEQ ID NO:60) sequences are indicated.

FIG. 39. Efficacy of VNP2000/erythromycin combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

FIG. 40. Efficacy of VNP2000/erythromycin combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

FIG. 41. Efficacy of VNP2000/erythromycin combination therapy on M27 lung carcinoma growth in C57BL/6 mice.

(135)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO. 000000

NO. 000000

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention utilizes attenuated tumor-targeted strains of bacteria to deliver high levels of foreignable primary effector molecule(s) to tumors. The present invention provides the advantage of bypassing potential immune toxicity of exogenous primary effector molecules (e.g., exotoxin shock caused by TME-10). The present invention provides delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to a solid tumor. More particularly, the invention encompasses the preparation and the use of engineered tumor-targeted bacteria, such as, e.g., *Salmonella*, as a vector for the delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s), to an appropriate site of action, e.g., the site of a solid tumor. Specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention are facultative anaerobes or facultative anaerobes, which are engineered to express one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s).

The attenuated tumor-targeted bacterial-based delivery system properly described provides local delivery of one or more effector molecule(s) to the site of solid tumors. The invention provides safe and effective methods by which a primary effector molecule(s), which may be toxic or induce an unwanted side effect (e.g., an unwanted immunological effect) when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella* with reduced toxicity to the host. The invention also provides combinatorial delivery of one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) which are delivered by an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. The invention also provides combinatorial delivery of different attenuated tumor-targeted bacteria carrying one or more different primary effector molecule(s) and/or optionally, one or more different secondary effector molecule(s).

The present invention also provides methods for local delivery of one or more fusion proteins comprising an effector molecule by attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express said fusion proteins at the site of the solid tumor(s). In one embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a fusion peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a fusion peptide and no effector molecule. In yet another embodiment, attenuated tumor-targeted

- 28 -

(136)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 01/28/01

PCT/JP00/03241

bacteria are engineered to express a fusion protein comprising a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a farnesyl peptide and an effector molecule. Attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules of the invention.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules.

The present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules. The present invention also provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules. Further, the present invention provides methods of treating solid tumor cancers in an animal, said methods comprising administering to an animal in need thereof an attenuated tumor-targeted bacteria engineered to contain one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins and one or more effector molecules. Preferably, the animal is a mammal (e.g., a dog, cat, a horse, a cow, a monkey, or a pig) and more preferably the animal is a human. Examples of solid tumor cancers include, but are not limited to, sarcomas, carcinomas, lymphomas, and other solid tumor cancers, including but not limited to, breast cancer, prostate cancer, cervical cancer, uterine cancer, lung cancer, ovarian cancer, testicular cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, gastric cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, anal cancer, glioma, pancreatic cancer, stomach cancer, liver cancer, colon cancer, central nervous system cancer, germ cell test cancer, melanoma, renal cancer, bladder cancer, and neuroblastoma.

Although not intending to be limited to any one mechanism, the inventor believes that the present invention results in the targeted expression of the effector molecule(s) at the site of a tumor by delivery of the attenuated tumor-targeted bacterial vector containing the effector molecule(s).

(137)

JP 2004-500042 A 2004.1.18

WO 00/00000

PCY000000000

For reasons of clarity, the detailed description is divided into the following subsections: Background; Primary Effector Molecules for Tumor Therapy; Secondary Effector Molecules for Co-expression With Primary Effector Molecules; Delivery and Analogous Fusion Proteins; Expression Vectors; and Methods and Compositions for Delivery.

3

5.1. BACTERIAL VECTORS

Any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention. More specifically, the attenuated tumor-targeted bacteria used in the methods of the invention are facultative aerobes or facultative anaerobes. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria that are facultative aerobes or facultative anaerobes which may be used in the methods of the invention include, but are not limited to, *Escherichia coli* including enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, and *Streptococcus* spp.

Factors contributing to attenuation and tumor-targeting are described herein and may be used to construct or select an appropriate bacterial strain for use in the methods of the invention. For example, methods to select and isolate tumor-targeted bacteria are described in Section 5.1, and methods to attenuate bacteria are described in Section 5.2 of International publication WO96/00233, which are incorporated herein by reference. Examples of attenuated tumor-targeted bacteria are also described in International Application WO98/12053, which is incorporated herein by reference in its entirety. In certain embodiments of the invention, a bacteria may be modified by methods known in the art to be attenuated or highly attenuated.

The present invention provides attenuated tumor-targeted bacteria as a vector for the delivery of one or more primary effector molecules (e.g., a TNF family member, a cytotoxic peptide or polypeptide, a tumor-inhibitory enzyme, or an anti-angiogenic factor) alone or in combination with a one or more secondary effector molecule(s). The present invention also provides attenuated tumor-targeted bacteria as a vector for the delivery of one or more fusion proteins of the invention alone or in combination with one or more effector molecules. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated tumor-targeted bacteria which is engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding effector molecules and/or fusion proteins is *Salmonella*.

While the teachings of the following section refer specifically to *Salmonella*, the compositions and methods of the invention are in no way meant to be restricted to *Salmonella* but encompass any other bacteria to which the teachings apply. Suitable bacterial species include, but are not limited to, *Escherichia coli* including enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*

-30-

(138)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/23372

PCT/US99/01264

motocytogenesis, Mycoplasma bacteria, Streptococcus spp., wherein the backbone is a facultative aerobic or facultative anaerobe.

5.1.1 *Salmonella* VECTORS

Any attenuated tumor-targeted bacteria can be modified using the teaching of the invention to encode one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful for the delivery of one or more effector molecules of the invention to a solid tumor.

Further, any attenuated tumor-targeted bacteria can be modified using the teaching of the invention to encode one or more fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful for the delivery of fusion proteins and effector molecules of the invention to a solid tumor.

Bacteria such as *Salmonella* is a causative agent of disease in humans and animals. One such disease that can be caused by *Salmonella* is typhoid, which is a serious problem because of the high mortality rate associated with the onset of septic shock (Bane, 1993, *Clinical Microbiol. Rev.* 6:57-69). Therefore, to allow the safe use of *Salmonella* vectors in the present invention, the bacterial vectors such as *Salmonella* are attenuated in their virulence for causing disease. In the present application, attenuation, in addition to its traditional definition in which a microorganism vector is modified so that the

microorganism vector is less pathogenic, is intended to include also the modification of a microorganism vector so that a lower risk of the derived microorganism vector can be administered to a patient and still achieve comparable results as if one had administered a higher titer of the parental microorganism vector. The end result serves to reduce the risk of toxic shock or other side effects due to administration of the vector to the patient. Such attenuated bacteria are isolated by means of a number of techniques. For example,

attenuation can be achieved by the deletion or disruption of DNA sequences which encode for virulence factors that insure survival of the bacteria in the host cell, especially macrophages and neutrophils. Such deletion or disruption techniques are well known in the art and include, for example, homologous recombination, chemical mutagenesis, radiation mutagenesis, or transposon mutagenesis. These virulence factors that are associated with survival in macrophages are usually specifically expressed when the macrophage is responsive to stress signals, for example, acidification, or in response to host cell defensive mechanisms such as macrophage cytotoxicity (Fiebis et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5148-5154). Table 4 of International Publication WO 95/49138 is an illustrative list of *Salmonella* virulence factors whose deletion results in attenuation.

Yet another method for the attenuation of the bacterial vectors, such as *Salmonella*, is to modify subunits of the bacteria which are responsible for the toxicity of the bacteria. For example, lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin is primarily responsible for

(139)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/00000

PCT/JP00/00000

the pathogenic effects of bacterial agents. The component of LPS which results in this response is Lipid A ("LA"). Elimination or mitigation of the toxic effects of LA results in an attenuated bacterium since 1) the risk of septic shock in the patient is reduced and 2) higher levels of the bacterium vector can be tolerated.

Altering the LA content of bacteria, such as *Salmonella*, can be achieved by the introduction of mutations in the LPS biosynthetic pathway. Several enzymatic steps in LPS biosynthesis and the genetic loci controlling them in *Salmonella* have been identified (Razee, 1993, i. Bacteriol. 175:5745-5753 and references therein), as well as corresponding mutants. One such attenuative mutant is *flaA*, a mutation within the gene that encodes the enzyme UDP-N-Acetylglucosamine 6-epimerase, which regulates the third step in enteric biosynthesis (Kellay et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:19665-19674). Bacterial strains bearing this type of mutation produce a Lipid A that differs from wild-type Lipid A in that it contains a seventh fatty acid, a hexadecanoic acid (Key and Coleman, 1994, J. Bacteriol. 176:1639-1646). Key and Coleman demonstrated that in addition to blocking the third step in enteric biosynthesis, the *flaA* mutation also decreases enzymatic activity of Lipid A, a kinase that regulates the sixth step of Lipid A biosynthesis.

In addition to being attenuated, the bacterial vectors of the invention are tumor-targeted, i.e. the bacteria preferentially attach to, infect, and/or remain viable in a tumor or tumor cell versus a normal tissue, non-tumor or non-tumor cell. Suitable methods for obtaining attenuated tumor-targeted bacteria are described in Section 6.1 (pages 25-32; tumor-targeting) and Section 6.2.2 (pages 43-51; tumor-targeting) of International Publication WO 96/02338, which are incorporated herein by reference. As the resulting vectors are highly specific and tumor-infective, the difference between the number of infecting bacteria found at the target tumor or tumor cell and compared to the non-specific counterparts becomes larger and larger as the dilution of the microorganism culture is increased such that lower levels of microorganism vectors can be used with positive results. The techniques described in International Publication WO 96/02338 can also be used to produce attenuated tumor-targeted *Salmonella* or non-*Salmonella* bacterial vectors.

An illustrative example of an attenuated tumor-targeted bacterium having an LPS pathway mutant is the *mutant Salmonella typhimurium* described in International Publication WO 99/10000, which is incorporated herein by reference in its entirety; and especially Section 6.1.2 which describes the characteristics of the *mutant Salmonella typhimurium*. One characteristic of the *mutant Salmonella typhimurium* is decreased ability to induce a TNF- α response compared to the wild-type bacterial vector. The *mutant Salmonella typhimurium* TNF- α response is at levels of about 5 percent to about 40 percent compared to the levels induced by wild-type *Salmonella*.

(146)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 01/2004/2

PCYACB0011001

The TNF- α response induced by whole bacteria or isolated or purified LPS can be assessed *in vitro* or *in vivo* using commercially available assay systems such as by enzyme linked immunosorbent (ELISA). Comparison of TNF- α production on a per colony forming unit ("c.f.u.") or on a μ g/lg basis, is used to determine relative activity. Lower TNF- α levels on a per unit basis indicate decreased induction of TNF- α production. In a preferred embodiment, the *msbB* *Salmonella* vector is modified to optimize one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) of the invention.

The present invention also encompasses the use of derivatives of *msbB* attenuated tumor-targeted *Salmonella* mutants. Derivatives of *msbB* attenuated tumor-targeted *Salmonella* mutants can be constructed using the heading of the invention to encode one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to produce a novel attenuated tumor-targeted bacteria useful in the delivery of one or more effector molecule(s) of the invention to a solid tumor.

The stability of the attenuated phenotype is important such that the strain does not revert to a more virulent phenotype during the course of treatment of a patient. Such stability can be achieved, for example, by providing that the virulence gene is disrupted by deletion or other non-reverting mutations on the chromosomal level rather than episomally.

Another method of ensuring the attenuated phenotype is to engineer the bacteria such that it is attenuated by more than one manner, e.g., a mutation in the pathway for lipi A production, such as the *msbB* mutation (International Publication WO 99/13033) and one or more mutations to attenuate for one or more molecules or metabolites, such as urease biosynthesis, nucleic biosynthesis, and arginine biosynthesis as described by Kaper, 1982, J. Bacteriol. 143:926-933. In a preferred embodiment, the tumor-targeted *msbB* *Salmonella* encoding or expressing at least one primary effector molecule is also auxotrophic for purine. In certain embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria encoding or expressing at least one primary effector molecule are attenuated by the presence of a mutation in *msbB*, *ParA* or *ParC*. In other embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria encoding at least one primary effector molecule are attenuated by the presence of a deletion in *hcrA*, *msbB*, *ParA* or *ParC*.

Accordingly, any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention to express and deliver one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s) to a solid tumor cancer. In preferred embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria are constructed to express one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s). Further, any attenuated tumor-targeted bacteria may be used in the methods of the invention to express and deliver one or more effector molecule(s) and optionally, one or

(141)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

ABSTRACT

PCYAB00000000

more effector molecules to a solid tumor cancer. In preferred embodiments, the attenuated tumor-targeted bacteria are constructed to express one or more fusion proteins and optionally, one or more effector molecules.

52. PRIMARY EFFECTOR MOLECULES FOR TUMOR THERAPY

The invention provides for delivery of primary (and optionally secondary) effector molecule(s) by attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Salmonella*. The effector molecule(s) of the invention are prokaryotic molecules, (e.g., protein (including but not limited to peptide, polypeptide, protein, post-translationally modified protein, etc.). The invention further provides nucleic acid molecules which encode the primary effector molecule(s) of the invention.

The primary effector molecules can be derived from any known organism, including, but not limited to, animals, plants, bacteria, fungi, and protozoa, or viruses. In a preferred embodiment of the invention, the primary effector molecule(s) is derived from a mammal. In a more preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is derived from a human. The primary effector molecule(s) of the invention comprise members of the TNF family, anti-apoptotic factors, cytotoxic polypeptides or peptides, tumor inhibitory enzymes, and functional fragments thereof.

In a specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are members of the TNF family or functional fragments thereof. Examples of TNF family members, include, but are not limited to, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), CD40 ligand (CD40L), LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, VISTA, TNFSF16, TNFSF17, and MITRL. In a preferred embodiment, a primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), and CD40 ligand (CD40L), or a functional fragment thereof. For review see, e.g., Coca, B. et al., 1999, Curr. Opin. Immunol., 11:340-345, which describes members of the TNF family. Also, Table 1 herein below, lists classic and associated members of the TNF family. In a preferred embodiment of the invention the primary effector molecule of the invention is tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TNF- α -related activation-induced cytokine (TRANCE), TNF- α -related weak inducer of apoptosis (TWEAK), or CD40 ligand (CD40L).

(142)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD01/2347

PCYKES003247

TABLE 1

TNF FAMILY MEMBERS	
Classic Nomenclature	Standardized Nomenclature
LT- α	TNFSF1
TNF- α	TNFSF2
LT- β	TNFSF3
OX40L	TNFSF4
CD30L	TNFSF5
F-L	TNFSF6
CD27L	TNFSF7
CD30L	TNFSF8
4-1BBL	TNFSF9
TRAIL	TNFSF10
TRANCE	TNFSF11
FWAAL	TNFSF12
APRIL	TNFSF13
LIGHT	TNFSF14
TL1	TNFSF15
...	TNFSF16
...	TNFSF17
ASTRAL	TNFSF18

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are anti-angiogenic factors or functional fragments thereof. Examples of anti-angiogenic factors, include, but are not limited to, erythropoietin, angiotensin, angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme (ACE), the 29 kDa N-terminal and a 49 kDa C-terminal proteolytic fragments of fibronectin, a 66 kDa receptor antagonist, the 16 kDa proteolytic fragment of gelatinase, the 7.8 kDa proteolytic fragment of plasminogen activator, the anti-angiogenic 24 amino acid fragment of plasminogen activator, the anti-angiogenic factor designated 13.10, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of dexamethasone, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, RGD and NGR containing peptides, the anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen and HSP, and peptide antagonists of integrin $\alpha_5\beta_1$ and the VEGF receptor.

(143)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/2387

PCT/JP00/03324

In a preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is endothelin. Naturally occurring endothelin consists of the C-terminal -78D amino acids of collagen XVIII (cDNAs encoding two splice forms of collagen XVIII have Genbank Accession Nos. AF18381 and AF18382).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is plasminogen fragment (the coding sequence for plasminogen can be found in Genbank Accession No. M020309 and A31036). Angiotensin peptides naturally include the four kringle domains of plasminogen, kringle 1 through kringle 4. It has been demonstrated that endothelins, kringle 1, 2 and 3 possess the anti-angiogenic properties of the native peptide, whereas kringle 4 has no such activity (Cao et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:29461-29467). Accordingly, the angiotensin effector molecule of the invention comprises at least one and preferably more than one kringle domain selected from the group consisting of kringle 1, kringle 2 and kringle 3. In a specific embodiment, the primary effector molecule of the invention is a human angiotensin molecule selected from the group consisting of 40 kDa isoform, the 42 kDa isoform, the 45 kDa isoform, or a combination thereof. In another embodiment, the primary effector molecule is the kringle 3 domain of plasminogen, which is a more potent inhibitor of angiogenesis than angiotensin (angiotensin comprises kringle domains 1-4).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is antithrombin III. Antithrombin III, which is referred to hereinafter as antithrombin, comprises a heparin binding domain that anchors the protein to the vasculature walls, and an active site loop which interacts with thrombin. When antithrombin is anchored to heparin, the protein elicits a conformational change that allows the active loop to interact with thrombin, resulting in the proteolytic cleavage of said loop by thrombin. The proteolytic cleavage event results in another change of conformation of antithrombin, which (i) alters the interaction interface between thrombin and antithrombin and (ii) releases the complex from heparin (O'Reilly, 1999, Science 285:1861-1862, and references therein). O'Reilly et al. (1999, Science 285:1861-1862) have discovered that the cleaved antithrombin has potent anti-angiogenic activity. Accordingly, in one embodiment, the anti-angiogenic factor of the invention is the anti-angiogenic form of antithrombin. For the delivery of said protein to a cell target according to the methods of the invention, the bacterial vector is modified to express full length antithrombin (Genbank Accession No. M01_000488 and a proteolytic enzyme that catalyzes the cleavage of antithrombin to produce the anti-angiogenic form of the protein. The proteolytic enzyme is selected from the group comprising thrombin, pancreatic elastase, and human neutrophil elastase. In a preferred embodiment, the proteolytic enzyme is pancreatic elastase. Methods for the recombinant expression of functional protease/oligase are taught by Sklar (Sklar et al., 1987, J. Biochem. 102:355-362).

(144)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/000000000000

PCYACB000000000000

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 40 kDa and/or 29 kDa proteolytic fragment of fibrinogen. The expression vectors for these fragments can be generated by standard methods using the full length nucleic acid sequence encoding the fibrinogen precursor protein (Genbank Accession No. M69761), and a description of the structure of the encoded protein. In a preferred embodiment the 40 kDa and/or 29 kDa fragment of fibrinogen is expressed as a cytoplasmic protein under the control of the *lac* promoter, for example by insertion into the pF109A plasmid.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a modified platelet-derived growth factor (PDGF) receptor antagonist. In one mode of the embodiment, the antagonist is a dominant negative variant of PDGF (see, e.g., Crowley *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6021-6023). In another mode of the embodiment, the antagonist is a peptide antagonist or a fusion protein thereof (Goodwin *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7173-7175). In yet another mode of the embodiment, the antagonist is a dominant negative soluble PDGF receptor (Mee *et al.*, 1996, Cancer Res. 56:2423-2427).

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 16 kDa N-terminal fragment of procathepsin, comprising approximately 120 amino acids, or a biologically active fragment thereof (the coding sequence for procathepsin can be found in Genbank Accession No. M69761). In a specific embodiment, rat procathepsin fragment has a Cys58→Ser55 mutation to circumvent unbalanced cross-linking of the protein by disulfide bonds.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is the 7.8 kDa platelet factor-4 fragment. In a specific embodiment, the 7.8 kDa platelet factor-4 fragment is expressed as a fusion protein wherein the amino terminal comprises the first 35 amino acids of α_1 and β -glucuronidase. In another embodiment, the heparin binding domain of platelet factor-4 are mutated to glutamate acid residues, which results in a variant protein having potent anti-angiogenic activity (Mallat *et al.*, 1991, Cancer Res. 51:2077-2083). The coding sequence for platelet factor-4 has the Genbank Accession No. M69761.

In another preferred embodiment of the invention, a primary effector molecule of the invention is a small peptide corresponding to the anti-angiogenic 13 amino acid fragment of platelet factor-4, the anti-angiogenic factor designated 75.00, the anti-angiogenic 22 amino acid peptide fragment of thrombospondin 1, the anti-angiogenic 20 amino acid peptide fragment of SPARC, the anti-angiogenic peptides of laminin, fibronectin, procollagen, or EGF, or small peptide analogs of integrin $\alpha_5\beta_1$ or the VEGF receptor. In a specific embodiment, the small peptides are expressed in bacteria to increase protein stability. The sequences of the small peptides are provided by Cao (1993, *Proc.*

(145)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/23287

PCY/0300/23287

Mol. Subcell. Biol. 30:161-176), with the exception of VEGF receptor antagonists (Sohar et al., 1993, J. Biol. Chem. 272:31512-3 (1998)). In a highly preferred embodiment, the small peptide comprises an RGD or NGR motif. In certain modes of the embodiment, the RGD or NGR containing peptide is presented on the cell surface of the host bacteria, for example by fusing the nucleic acid encoding the peptide in frame with a nucleic acid encoding one or more extracellular loops of OmpA.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are cytotoxic polypeptides or peptides, or fragments thereof. A cytotoxic polypeptide or peptide is cytotoxic or cytostatic to a cell, for example, by inhibiting cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a product may act by cleaving rRNA, or ribonucleoprotein, inhibiting an elongation factor, cleaving mRNA, or other mechanism that reduced protein synthesis to a level such that the cell cannot survive.

Examples of cytotoxic polypeptides or peptides include, but are not limited to, members of the bacteriocin family, verotoxin, cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1; e.g., *E. coli* CNF1 and *Shiga toxin* CNF1), cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2), *Enterococcus* multi-toxin (EMT), hemolysin, CAX, terpenes which are potent covalent inhibitors of thymidylate synthase, spermin, the ricin, abrin, other ribosome inactivating proteins (RIPs), *Pseudomonas* cytotoxin, inhibitors of DNA, RNA or protein synthesis, antisense nucleic acids, other metabolic inhibitors (e.g., DNA or RNA cleaving molecules such as *Oxytetracycline*, *kanamycin*, *flavonoids*, *phenololipids*), protein connecting enzymes (e.g., *thymidine kinase* from HSV and bacterial cytosine deaminase), light-activated purpura, *ricin*, *ricin A chain*, *maize RIP*, *gelatin*, *cytotoxic* *distending* *toxins*, *diphtheria toxin*, *cholera toxin A chain*, *ulcer toxin*, *trichothecene*, *potent* *antitumor* *protein* (PAP), *metastasis* *inhibitor* *protein* (MAP), *Dinacine* 32 and 36, *abrin*, *maize* *toxin*, *pyridine*, *stigma*, *a* *synthetic* *inhibitor* *of* *protein* *biogenesis* *from* *carbamate* *seeds* (see, e.g., International Publication WO 95/24579), *Pseudomonas* *cytotoxin*, *E. coli* *heat-labile* *toxin*, *E. coli* *heat-stable* *toxin*, *Shiga* *toxin* *1* (ST1), *biologically* *active* *fragments* *of* *cytotoxins* *and* *others* *known* *to* *be* *of* *skill* *in* *the* *art*. See, e.g., O'Brien and Holmes, *Toxins*, *Toxins* *of* *Escherichia coli* *and* *Salmonella* *in* *Bacteriology* *and* *Salmonella*, *Cellular* *and* *Molecular* *Biology*, *Neidhardt* *et al.* (eds.), pp. 2188-2602, ASM Press, Washington, D.C. for a review of *E. coli* *and* *Salmonella* *toxins*.

In a preferred embodiment, the primary effector molecule is a member of the bacteriocin family (see e.g., Knochel, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 36:123-144), with the proviso that said bacteriocin family member is not a bacteriocin release protein (BRP). Examples of bacteriocin family members, *listeria*, but are not limited to, *Colicin*, *Colicin A*, *Colicin B*, *Colicin C*, *Colicin D*, *Colicin E*, *Colicin F*, *Colicin G*, *Colicin H*, *Colicin I*, *Colicin J*, *Colicin K*, *Colicin L*, *Colicin M*, *Colicin N*, *Colicin O*, *Colicin P*, *Colicin Q*, *Colicin R*, *Colicin S*, *Colicin T*, *Colicin U*, *Colicin V*, *Colicin W*, *Colicin X*, *Colicin Y*, *Colicin Z*, *Colicin AA*, *Colicin AB*, *Colicin AC*, *Colicin AD*, *Colicin AE*, *Colicin AF*, *Colicin AG*, *Colicin AH*, *Colicin AI*, *Colicin AJ*, *Colicin AK*, *Colicin AL*, *Colicin AM*, *Colicin AN*, *Colicin AO*, *Colicin AP*, *Colicin AQ*, *Colicin AR*, *Colicin AS*, *Colicin AT*, *Colicin AU*, *Colicin AV*, *Colicin AW*, *Colicin AX*, *Colicin AY*, *Colicin AZ*, *Colicin BA*, *Colicin BB*, *Colicin BC*, *Colicin BD*, *Colicin BE*, *Colicin BF*, *Colicin BG*, *Colicin BH*, *Colicin BI*, *Colicin BJ*, *Colicin BK*, *Colicin BL*, *Colicin BM*, *Colicin BN*, *Colicin BO*, *Colicin BP*, *Colicin BQ*, *Colicin BR*, *Colicin BS*, *Colicin BT*, *Colicin BU*, *Colicin BV*, *Colicin BW*, *Colicin BX*, *Colicin BY*, *Colicin BZ*, *Colicin CA*, *Colicin CB*, *Colicin CC*, *Colicin CD*, *Colicin CE*, *Colicin CF*, *Colicin CG*, *Colicin CH*, *Colicin CI*, *Colicin CJ*, *Colicin CK*, *Colicin CL*, *Colicin CM*, *Colicin CN*, *Colicin CO*, *Colicin CP*, *Colicin CQ*, *Colicin CR*, *Colicin CS*, *Colicin CT*, *Colicin CU*, *Colicin CV*, *Colicin CW*, *Colicin CX*, *Colicin CY*, *Colicin CZ*, *Colicin DA*, *Colicin DB*, *Colicin DC*, *Colicin DD*, *Colicin DE*, *Colicin DF*, *Colicin DG*, *Colicin DH*, *Colicin DI*, *Colicin DJ*, *Colicin DK*, *Colicin DL*, *Colicin DM*, *Colicin DN*, *Colicin DO*, *Colicin DP*, *Colicin DQ*, *Colicin DR*, *Colicin DS*, *Colicin DT*, *Colicin DU*, *Colicin DV*, *Colicin DW*, *Colicin DX*, *Colicin DY*, *Colicin DZ*, *Colicin EA*, *Colicin EB*, *Colicin EC*, *Colicin ED*, *Colicin EE*, *Colicin EF*, *Colicin EG*, *Colicin EH*, *Colicin EI*, *Colicin EJ*, *Colicin EK*, *Colicin EL*, *Colicin EM*, *Colicin EN*, *Colicin EO*, *Colicin EP*, *Colicin EQ*, *Colicin ER*, *Colicin ES*, *Colicin ET*, *Colicin EU*, *Colicin EV*, *Colicin EW*, *Colicin EX*, *Colicin EY*, *Colicin EZ*, *Colicin FA*, *Colicin FB*, *Colicin FC*, *Colicin FD*, *Colicin FE*, *Colicin FF*, *Colicin FG*, *Colicin FH*, *Colicin FI*, *Colicin FJ*, *Colicin FK*, *Colicin FL*, *Colicin FM*, *Colicin FN*, *Colicin FO*, *Colicin FP*, *Colicin FQ*, *Colicin FR*, *Colicin FS*, *Colicin FT*, *Colicin FU*, *Colicin FV*, *Colicin FW*, *Colicin FX*, *Colicin FY*, *Colicin FZ*, *Colicin GA*, *Colicin GB*, *Colicin GC*, *Colicin GD*, *Colicin GE*, *Colicin GF*, *Colicin GG*, *Colicin GH*, *Colicin GI*, *Colicin GJ*, *Colicin GK*, *Colicin GL*, *Colicin GM*, *Colicin GN*, *Colicin GO*, *Colicin GP*, *Colicin GQ*, *Colicin GR*, *Colicin GS*, *Colicin GT*, *Colicin GU*, *Colicin GV*, *Colicin GW*, *Colicin GX*, *Colicin GY*, *Colicin GZ*, *Colicin HA*, *Colicin HB*, *Colicin HC*, *Colicin HD*, *Colicin HE*, *Colicin HF*, *Colicin HG*, *Colicin HH*, *Colicin HI*, *Colicin HJ*, *Colicin HK*, *Colicin HL*, *Colicin HM*, *Colicin HN*, *Colicin HO*, *Colicin HP*, *Colicin HQ*, *Colicin HR*, *Colicin HS*, *Colicin HT*, *Colicin HU*, *Colicin HV*, *Colicin HW*, *Colicin HX*, *Colicin HY*, *Colicin HZ*, *Colicin IA*, *Colicin IB*, *Colicin IC*, *Colicin ID*, *Colicin IE*, *Colicin IF*, *Colicin IG*, *Colicin IH*, *Colicin II*, *Colicin IJ*, *Colicin IK*, *Colicin IL*, *Colicin IM*, *Colicin IN*, *Colicin IO*, *Colicin IP*, *Colicin IQ*, *Colicin IR*, *Colicin IS*, *Colicin IT*, *Colicin IU*, *Colicin IV*, *Colicin IW*, *Colicin IX*, *Colicin IY*, *Colicin IZ*, *Colicin JA*, *Colicin JB*, *Colicin JC*, *Colicin JD*, *Colicin JE*, *Colicin JF*, *Colicin JG*, *Colicin JH*, *Colicin JI*, *Colicin JJ*, *Colicin JK*, *Colicin JL*, *Colicin JM*, *Colicin JN*, *Colicin JO*, *Colicin JP*, *Colicin JQ*, *Colicin JR*, *Colicin JS*, *Colicin JT*, *Colicin JU*, *Colicin JV*, *Colicin JW*, *Colicin JX*, *Colicin JY*, *Colicin JZ*, *Colicin KA*, *Colicin KB*, *Colicin KC*, *Colicin KD*, *Colicin KE*, *Colicin KF*, *Colicin KG*, *Colicin KH*, *Colicin KI*, *Colicin KJ*, *Colicin KK*, *Colicin KL*, *Colicin KM*, *Colicin KN*, *Colicin KO*, *Colicin KP*, *Colicin KQ*, *Colicin KR*, *Colicin KS*, *Colicin KT*, *Colicin KU*, *Colicin KV*, *Colicin KW*, *Colicin KX*, *Colicin KY*, *Colicin KZ*, *Colicin LA*, *Colicin LB*, *Colicin LC*, *Colicin LD*, *Colicin LE*, *Colicin LF*, *Colicin LG*, *Colicin LH*, *Colicin LI*, *Colicin LJ*, *Colicin LK*, *Colicin LL*, *Colicin LM*, *Colicin LN*, *Colicin LO*, *Colicin LP*, *Colicin LQ*, *Colicin LR*, *Colicin LS*, *Colicin LT*, *Colicin LU*, *Colicin LV*, *Colicin LW*, *Colicin LX*, *Colicin LY*, *Colicin LZ*, *Colicin MA*, *Colicin MB*, *Colicin MC*, *Colicin MD*, *Colicin ME*, *Colicin MF*, *Colicin MG*, *Colicin MH*, *Colicin MI*, *Colicin MJ*, *Colicin MK*, *Colicin ML*, *Colicin MM*, *Colicin MN*, *Colicin MO*, *Colicin MP*, *Colicin MQ*, *Colicin MR*, *Colicin MS*, *Colicin MT*, *Colicin MU*, *Colicin MV*, *Colicin MW*, *Colicin MX*, *Colicin MY*, *Colicin MZ*, *Colicin NA*, *Colicin NB*, *Colicin NC*, *Colicin ND*, *Colicin NE*, *Colicin NF*, *Colicin NG*, *Colicin NH*, *Colicin NI*, *Colicin NJ*, *Colicin NK*, *Colicin NL*, *Colicin NM*, *Colicin NN*, *Colicin NO*, *Colicin NP*, *Colicin NQ*, *Colicin NR*, *Colicin NS*, *Colicin NT*, *Colicin NU*, *Colicin NV*, *Colicin NW*, *Colicin NX*, *Colicin NY*, *Colicin NZ*, *Colicin OA*, *Colicin OB*, *Colicin OC*, *Colicin OD*, *Colicin OE*, *Colicin OF*, *Colicin OG*, *Colicin OH*, *Colicin OI*, *Colicin OJ*, *Colicin OK*, *Colicin OL*, *Colicin OM*, *Colicin ON*, *Colicin OO*, *Colicin OP*, *Colicin OQ*, *Colicin OR*, *Colicin OS*, *Colicin OT*, *Colicin OU*, *Colicin OV*, *Colicin OW*, *Colicin OX*, *Colicin OY*, *Colicin OZ*, *Colicin PA*, *Colicin PB*, *Colicin PC*, *Colicin PD*, *Colicin PE*, *Colicin PF*, *Colicin PG*, *Colicin PH*, *Colicin PI*, *Colicin PJ*, *Colicin PK*, *Colicin PL*, *Colicin PM*, *Colicin PN*, *Colicin PO*, *Colicin PP*, *Colicin PQ*, *Colicin PR*, *Colicin PS*, *Colicin PT*, *Colicin PU*, *Colicin PV*, *Colicin PW*, *Colicin PX*, *Colicin PY*, *Colicin PZ*, *Colicin QA*, *Colicin QB*, *Colicin QC*, *Colicin QD*, *Colicin QE*, *Colicin QF*, *Colicin QG*, *Colicin QH*, *Colicin QI*, *Colicin QJ*, *Colicin QK*, *Colicin QL*, *Colicin QM*, *Colicin QN*, *Colicin QO*, *Colicin QP*, *Colicin QQ*, *Colicin QR*, *Colicin QS*, *Colicin QT*, *Colicin QU*, *Colicin QV*, *Colicin QW*, *Colicin QX*, *Colicin QY*, *Colicin QZ*, *Colicin RA*, *Colicin RB*, *Colicin RC*, *Colicin RD*, *Colicin RE*, *Colicin RF*, *Colicin RG*, *Colicin RH*, *Colicin RI*, *Colicin RJ*, *Colicin RK*, *Colicin RL*, *Colicin RM*, *Colicin RN*, *Colicin RO*, *Colicin RP*, *Colicin RQ*, *Colicin RR*, *Colicin RS*, *Colicin RT*, *Colicin RU*, *Colicin RV*, *Colicin RW*, *Colicin RX*, *Colicin RY*, *Colicin RZ*, *Colicin SA*, *Colicin SB*, *Colicin SC*, *Colicin SD*, *Colicin SE*, *Colicin SF*, *Colicin SG*, *Colicin SH*, *Colicin SI*, *Colicin SJ*, *Colicin SK*, *Colicin SL*, *Colicin SM*, *Colicin SN*, *Colicin SO*, *Colicin SP*, *Colicin SQ*, *Colicin SR*, *Colicin SS*, *Colicin ST*, *Colicin SU*, *Colicin SV*, *Colicin SW*, *Colicin SX*, *Colicin SY*, *Colicin SZ*, *Colicin TA*, *Colicin TB*, *Colicin TC*, *Colicin TD*, *Colicin TE*, *Colicin TF*, *Colicin TG*, *Colicin TH*, *Colicin TI*, *Colicin TJ*, *Colicin TK*, *Colicin TL*, *Colicin TM*, *Colicin TN*, *Colicin TO*, *Colicin TP*, *Colicin TQ*, *Colicin TR*, *Colicin TS*, *Colicin TT*, *Colicin TU*, *Colicin TV*, *Colicin TW*, *Colicin TX*, *Colicin TY*, *Colicin TZ*, *Colicin UA*, *Colicin UB*, *Colicin UC*, *Colicin UD*, *Colicin UE*, *Colicin UF*, *Colicin UG*, *Colicin UH*, *Colicin UI*, *Colicin UJ*, *Colicin UK*, *Colicin UL*, *Colicin UM*, *Colicin UN*, *Colicin UO*, *Colicin UP*, *Colicin UQ*, *Colicin UR*, *Colicin US*, *Colicin UT*, *Colicin UU*, *Colicin UV*, *Colicin UW*, *Colicin UX*, *Colicin UY*, *Colicin UZ*, *Colicin VA*, *Colicin VB*, *Colicin VC*, *Colicin VD*, *Colicin VE*, *Colicin VF*, *Colicin VG*, *Colicin VH*, *Colicin VI*, *Colicin VJ*, *Colicin VK*, *Colicin VL*, *Colicin VM*, *Colicin VN*, *Colicin VO*, *Colicin VP*, *Colicin VQ*, *Colicin VR*, *Colicin VS*, *Colicin VT*, *Colicin VU*, *Colicin VV*, *Colicin VW*, *Colicin VX*, *Colicin VY*, *Colicin VZ*, *Colicin WA*, *Colicin WB*, *Colicin WC*, *Colicin WD*, *Colicin WE*, *Colicin WF*, *Colicin WG*, *Colicin WH*, *Colicin WI*, *Colicin WJ*, *Colicin WK*, *Colicin WL*, *Colicin WM*, *Colicin WN*, *Colicin WO*, *Colicin WP*, *Colicin WQ*, *Colicin WR*, *Colicin WS*, *Colicin WT*, *Colicin WU*, *Colicin WV*, *Colicin WW*, *Colicin WX*, *Colicin WY*, *Colicin WZ*, *Colicin XA*, *Colicin XB*, *Colicin XC*, *Colicin XD*, *Colicin XE*, *Colicin XF*, *Colicin XG*, *Colicin XH*, *Colicin XI*, *Colicin XJ*, *Colicin XK*, *Colicin XL*, *Colicin XM*, *Colicin XN*, *Colicin XO*, *Colicin XP*, *Colicin XQ*, *Colicin XR*, *Colicin XS*, *Colicin XT*, *Colicin XU*, *Colicin XV*, *Colicin XW*, *Colicin XX*, *Colicin XY*, *Colicin XZ*, *Colicin YA*, *Colicin YB*, *Colicin YC*, *Colicin YD*, *Colicin YE*, *Colicin YF*, *Colicin YG*, *Colicin YH*, *Colicin YI*, *Colicin YJ*, *Colicin YK*, *Colicin YL*, *Colicin YM*, *Colicin YN*, *Colicin YO*, *Colicin YP*, *Colicin YQ*, *Colicin YR*, *Colicin YS*, *Colicin YT*, *Colicin YU*, *Colicin YV*, *Colicin YW*, *Colicin YX*, *Colicin YY*, *Colicin YZ*, *Colicin ZA*, *Colicin ZB*, *Colicin ZC*, *Colicin ZD*, *Colicin ZE*, *Colicin ZF*, *Colicin ZG*, *Colicin ZH*, *Colicin ZI*, *Colicin ZJ*, *Colicin ZK*, *Colicin ZL*, *Colicin ZM*, *Colicin ZN*, *Colicin ZO*, *Colicin ZP*, *Colicin ZQ*, *Colicin ZR*, *Colicin ZS*, *Colicin ZT*, *Colicin ZU*, *Colicin ZV*, *Colicin ZW*, *Colicin ZX*, *Colicin ZY*, *Colicin ZZ*.

- 38 -

(146)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/28707

EC:K438032323

protein R1 or AP43, magasin A-236, microcin M15, and virocin (Jayaraman and Tarkenton-Fletcher, 1976, *J. Bacteriology* vol. 132 pp 382-385). Most probably the primary effector molecule(s) is colicin E3 or V, although colicins A, E1, E2, Ia, Ia', L, and M (see, Krasilsky, 1982, *Annu. Rev. Microbiol.* 36:123-144) are also possible as primary effector molecule(s). In another preferred mode of this embodiment, the bacterium is a Gram-negative bacterium, most preferably *Escherichia coli*.

In a preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is ColE1, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, or ColE9. Colicin E3 (ColE3) has been shown to have a profoundly cytotoxic effect on mammalian cells (Stern et al., 1978, *Polio Microbiol.* 21:272-277), including a leukemia cell model system (Pisla et al., 1978, *Exposure* 35:405-40). ColE3 cytotoxicity is a function of protein synthesis arrest, mediated by inhibition of 80S ribosomes (Tarnovsky et al., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:327-334). More specifically, ColE3 has ribonuclease activity (Stern et al., 1978, *Nature* 274:113-114). In its naturally occurring form, ColE3 is a 69-kDa protein complex consisting of a 50-kDa and a 19-kDa protein in a 1:1 ratio, the larger subunit having the nuclease activity and the smaller subunit having inhibitory function of the 50-kDa subunit. Thus, the 50-kDa protein acts as a cytotoxic protein (or toxin), and the 19-kDa protein acts as an anti-toxin. Accordingly, in one embodiment, when ColE3 is used as a secondary effector molecule, the larger ColE3 subunit or an active fragment thereof is expressed alone or at higher levels than the smaller subunit. In another embodiment of the invention, the ColE3 50-kDa toxin and 19-kDa anti-toxin are co-expressed on a single plasmid within an attenuated host-targeted bacteria, such as *Salmonella*. In this embodiment, the *Salmonella* can act as a selection system for the *Salmonella* which carry the plasmid, such that *Salmonella* which lose the plasmid are killed by the toxin. In another embodiment, the 10 kDa anti-toxin is on the chromosome, separate from the ColE3 toxin on the plasmid, resulting in a barrier to transfection to other bacteria. (See Section 3.6, *infra*).

In another preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is colicin DF13. Colicin DF13 functions in an analogous manner to ColE3. The protein complex is of 57-kDa molecular weight. The individual components are 57-kDa and 9-kDa in size. In addition to its ribonuclease activity, DF13 can cause the leakage of cellular contents.

In another preferred embodiment, the primary effector molecule(s) is colicin V (Pugsley, A.P. and Chidgey, R. "Methods for Studying Colicins and Their Phages" in *Phages, a Practical Approach* 1987, ed. by K.G. Hardy, Gilmour, L. et al. IRL Press, 387-394).

In another embodiment, the primary effector molecule(s) is colicin E2 (a subunit colicin similar to ColE3) in structure but with endonuclease rather than ribonuclease activity; colicins A, E1, Ia, Ia', or K, which form ion-permeable channels, causing a collapse of the proton motive force of the cell and leading to cell death; colicin L which

(147)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/52777

PCYACB0012342

inhibits protein, DNA & RNA synthesis; colicin D4 which causes cell lysis by altering the genetic environment of the cell; penicillin A122 which functions in a manner similar to colicin B function; streptococin 1589, a pore-forming bacteriocin; bartrelin 7623 which indirectly inhibits DNA, DNA and protein synthesis through an unknown target; Pyocidin P3, or protein resembling a bacteriophage tail protein that kills cells by interrupting respiration from solute transport; Pyocidin AP41 which uses a cell's E2-like cycle of action; or nisin A-214 which is a phospholipase that causes leakage of intracellular material (for a general review of bacteriocins, see Kmetzky, 1982, *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 123-145); colicin A (Pegibay, A.P. and Omerog, B. "Methods for Studying Colicins and Their Plasmids" in "Plasmids, a Practical Approach 1987, ed. By K.G. Hardy).

Accordingly, a primary effector molecule may comprise any bacteriocin described herein or known in the art, with the proviso that said bacteriocin is not a bacteriocin release protein.

In another specific embodiment, the primary effector molecules of the invention are immunoinhibitory enzymes or functional fragments thereof. Examples of immunoinhibitory enzymes include, but are not limited, neuraminase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, ribonuclease, DNAse, and glycosidase. In a preferred embodiment, the primary effector molecule is neuraminase.

The primary effector molecules of the invention are useful, for example, to treat, or prevent a solid tumor lesion such as a carcinoma, melanoma, lymphoma, or sarcoma.

The invention provides nucleic acid molecules encoding a primary effector molecule. The invention also provides nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecule(s) and optionally, one or more secondary effector molecule(s). The invention provides nucleic acids encoding effector molecule(s) of the invention which is operably linked to an appropriate promoter. Optionally, the nucleic acids encoding an effector molecule(s) may be operably linked to other elements that participate in transcription, translation, localization, stability and the like.

The nucleic acid molecule encoding a primary effector molecule is from about 6 to about 100,000 base pairs in length. Preferably, the nucleic acid is from about 20 base pairs to about 50,000 base pairs in length. More preferably, the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 10,000 base pairs in length. Even more preferably, the nucleic acid molecule is about 25 base pairs to about 4500 base pairs in length.

5.3. SECONDARY EFFECTOR MOLECULES FOR CO-EXPRESSION WITH PRIMARY EFFECTOR MOLECULES

In certain embodiments of the invention, the primary effector molecule (e.g., a TNF family member, a cytotoxic peptide or polypeptide, an anti-angiogenic factor, or a tumor

(148)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/02777

PC VACCINIZING

solubility enzyme) is optionally co-expressed in a bacterial vector with another molecule, i.e. a secondary effector molecule. The secondary effector molecule provides additional therapeutic value and/or facilitates the release of the contents of the modified bacterial vector (which comprises at least one primary effector molecule and optionally one or more secondary effector molecules) into the surrounding environment. As used herein, the term "additional therapeutic effect" indicates that the secondary effector molecule provides an additive or synergistic, cytotoxic, or cytotoxic effect on a target, e.g., in addition to that provided by the primary effector molecule(s). Thus, a secondary effector molecule functions as an additional therapeutic factor and/or a release factor. Preferably, the secondary effector molecule, whether a therapeutic or release factor (or both), is preferentially or specifically activated or expressed at the destination, i.e. at the site of the target. In certain embodiments, the secondary effector molecule can serve two functions, i.e. promote the release of the bacterial cell contents (e.g., by promoting bacterial cell lysis or equal lysis) and provide therapeutic value (e.g., by cytotoxicity to the tumor cells). In certain non-limiting embodiments, the cytotoxicity of the secondary effector molecule can be mediated by the patient's immune system; accordingly such a secondary effector molecule can function as an immunomodulator.

In certain embodiments of the invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vector of the invention is engineered to express at least one secondary effector molecule which has anti-tumor activity, i.e. expression of the secondary effector molecule results in killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells.

The secondary effector molecule is preferably a protein or a nucleic acid molecule. The nucleic acid molecule can be double-stranded or single-stranded DNA or double-stranded or single-stranded RNA, as well as triplex nucleic acid molecules. The nucleic acid molecule can function as a ribozyme, or antisense molecule, etc.

Antisense molecules are oligonucleotides that bind in a sequence-specific manner to nucleic acids, such as mRNA or DNA. When bound to mRNA that has complementary sequences, antisense prevents translation of the mRNA (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,198,053; 5,490,931; 5,135,917; and 5,037,617). Triplex molecules refer to single DNA strands that bind duplex DNA, forming a covalent triplex molecule, thereby preventing transcription (see, e.g., U.S. Patent No. 5,176,046).

A ribozyme is an RNA molecule that specifically cleaves RNA substrates, such as mRNA, resulting in inhibition or interference with cell growth or expression. There are at least five known classes of ribozymes involved in the cleavage and/or ligation of RNA chains. Ribozymes can be targeted to any RNA transcript and can catalytically cleave that transcript (see, e.g., U.S. Patent No. 5,272,262; U.S. Patent No. 5,144,019; and U.S. Patent Nos. 5,168,653, 5,180,818, 5,116,742 and 5,093,266).

(149)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/28387

PCX050012222

As described above for the primary effector molecule, a nucleic acid encoding or comprising a secondary effector molecule is provided in operative linkage with a selected promoter, and optionally in operative linkage with other elements that participate in transcription, translation, localization, stability and/or the like. Further, the secondary effector molecule can be expressed using the same promoter as the primary effector molecule and an internal ribosome binding site, or using a different promoter than the primary effector molecule.

This nucleic acid molecule encoding the secondary effector molecule is from about 5 base pairs to about 100,000 base pairs in length. Preferably the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 50,000 base pairs in length. More preferably the nucleic acid molecule is from about 20 base pairs to about 10,000 base pairs in length. Even more preferably, it is a nucleic acid molecule from about 20 pairs to about 4,000 base pairs in length.

The nucleotide sequence of the effector molecule encoding the secondary effector molecule described below are well known (see Greenberg). A nucleic acid molecule encoding a secondary effector molecule, which secondary effector molecule is a cytotoxic or cytostatic factor or a biologically active ligand, variant or derivative thereof, may be isolated by standard methods, such as amplification (e.g., PCR), probe hybridization of genomic or cDNA libraries, antibody screening of expression libraries, chemically synthesized or obtained from commercial or other sources.

Nucleic acid molecules and oligonucleotides for use as described herein can be synthesized by any method known to those of skill in the art (see, e.g., International Publication WO 93/01286, U.S. Patent Nos. 5,243,044; 5,173,269; and 5,169,124). Identification of oligonucleotides and the ways for use as antisense agents involve methods well known in the art.

5.3.1. FACTORS PROVIDING ADDITIONAL THERAPEUTIC VALUE

In certain embodiments of the invention, the selected tumor-targeted bacterial vector of the invention, which expresses at least one primary effector molecule and is preferably a *Shigella* vector, expresses at least one secondary effector molecule which has anti-tumor activity, i.e. expression of the secondary effector molecule results in killing or inhibition of the growth of a tumor or tumor cells or spread of tumor cells, thereby augmenting the cytotoxic or cytostatic action of the primary effector molecule. In one embodiment, the effects on the tumor of the secondary effector molecule are additive to those of the primary effector molecule. In a preferred embodiment, the effects are synergistic or synergistic, i.e. greater than the sum of the effects of the primary and secondary effector molecules if administered separately.

-42-

(150)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/5277

PCYA00013333

in certain embodiments, the secondary effector molecule is cytotoxic or cytostatic to a cell by inhibiting cell growth through interference with protein synthesis or through disruption of the cell cycle. Such a product may act, for example, by cleaving mRNA or ribonucleoproteins, inhibiting an elongation factor, cleaving mRNA, or other mechanisms that reduced protein synthesis to a level such that the cell cannot survive. Examples of such secondary effector molecules include but are not limited to asparaginase, the ricin, diphtheria, and other ribosome inactivating proteins (RIPs).

In another embodiment, the secondary effector molecule is a pro-drug converting enzyme or nucleic acid encoding the same, i.e. an enzyme that modulates the chemical nature of a drug to produce a cytotoxic agent. Illustrative examples of pro-drug converting enzymes are listed on page 33 and in Table 2 of WO 96/40238 by Pawlisch et al., which is incorporated herein by reference. WO 96/0223 also teaches methods for production of secreted fusion proteins comprising such pro-drug converting enzymes. According to the present invention, a pro-drug converting enzyme need not be a secreted protein if co-expressed with a release factor such as BRF (see, *infra*, Section 3.3.2). In a specific embodiment, the pro-drug converting enzyme is cytosolic p150 NADPH oxidoreductase which acts upon mitomycin C and podofiloxin (Murray et al., 1994, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 270:643-649). In another embodiment, the secondary effector molecule(s) is co-expressed with a release factor such as BRF, and cause the release of co-factors (e.g., NADH, NADPH, ATP, etc.) which enhance pro-drug converting enzyme activity. In another mode of the embodiment, a secondary effector molecule is co-expressed with a release factor such as BRF, leading to the release of an activated drug (e.g., a drug which is activated within the bacterial cytoplasm or periplasm, and then released from the bacterial vesicle).

In another embodiment, a secondary effector molecule is an inhibitor of inducible nitric oxide synthase (NOS) or of endothelial nitric oxide synthase. Nitric oxide (NO) is implicated to be involved in the regulation of vascular growth and in atherosclerosis. NO is formed from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) and modulates immune, inflammatory and cardiovascular responses.

In another embodiment, the secondary effector molecule is cytotoxic or cytostatic to a cell by inhibiting the production or activity of a protein involved in cell proliferation, such as an oncogene or growth factor, (e.g., bFGF, int-2, bcr-1/Kc-FGF, FGF-5, int-2/FGF-6, FGF-8) or cellular receptor or ligand. The inhibition can be at the level of transcription or translation (mediated by a secondary effector molecule that is a ribosome or triplex DNA), or at the level of protein activity (mediated by a secondary effector molecule that is an inhibitor of a growth factor pathway, such as a dominant negative mutant).

In another embodiment, a secondary effector molecule is a cytokine, chemokine, or an immunomodulating protein or a nucleic acid encoding the same, such as interleukin-1

(151)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/28277

PCT/JP00/03242

- (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-10 (IL-10), interleukin-15 (IL-15), interleukin-18 (IL-18), endothelial secretory phospholipase-2 (EMAP2), GM-CSF, IFN- γ , IFN- α , MIP-3 α , SLC, MIP-3 β , or an MHC gene, such as HLA-B7. Delivery of such immunomodulating effector molecules will modulate the immune system, increasing the potential for host antitumor immunity. Alternatively, nucleic acid molecules encoding costimulatory molecules, such as B7.1 and B7.2, ligands for both CD28 and CTLA-4, can also be delivered to enhance T cell mediated immunity. Yet another immunomodulating agent is, α -1,3-galactosyl transferase, whose expression on tumor cells elicits complement-mediated cell killing. Further, another immunomodulating agent is a tumor-associated antigen, i.e. a molecule specifically that is expressed by a tumor cell and not in the non-tumorous counterpart cell, or is expressed at the tumor cell at a higher level than in the non-tumorous counterpart cell. Illustrative examples of tumor-associated antigens are described in Kubly, *Immunology*, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 1st Edition (1992), pp. 515-520 which is incorporated by reference herein. Other examples of tumor-associated antigens not known to those of skill in the art.
- In another embodiment, a secondary effector molecule is a P1-S ligand or nucleic acid encoding the same. In another embodiment, a secondary molecule is B220.
- In a specific embodiment, a secondary effector molecule is not a TNF family member when the primary effector molecule is a TNF family member. In another specific embodiment, a secondary effector molecule is not an anti-angiogenic factor when the primary effector molecule is an anti-angiogenic factor. In another specific embodiment, a secondary molecule is not a cytotoxic peptide or polypeptide when the secondary molecule is a cytotoxic peptide or polypeptide. In another specific embodiment, a secondary molecule is not a tumor inhibiting enzyme when the primary effector molecule is a tumor inhibiting enzyme.

23 5.3.3. FACTORS THAT PROMOTE THE RELEASE OF ANTI-TUMOR EFFECTOR MOLECULES INTO THE TUMOR ENVIRONMENT

- In certain other embodiments of the invention, the associated tumor-targeted bacterial vector of the invention, which expresses at least one primary effector molecule and is preferably a *Salmonella* vector, expresses at least one secondary effector molecule which functions to permeabilize the bacterial cell membrane(s) or enhance the release of intracellular components into the extracellular environment, e.g. at the tumor site, thereby enhancing the delivery of the primary and/or secondary effector molecule(s). Such secondary effector molecule which permeabilizes the bacterial cell or enhances release is designated "a release factor". In certain embodiments, the release factor also autonomously has anti-tumor activity.

- 44 -

(152)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/28271

PCT/JP00/03242

The release factor expressed by the bacterial vector of the invention may be reogenous to the modified attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (e.g., encoded by a nucleic acid that is not present in the attenuated tumor-targeted bacteria). A release factor may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A release factor may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In one embodiment, the release factor is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising a primary effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the release factor allows for enhanced release of the fusion protein from the periplasmic space.

In a preferred embodiment, such a factor is one of the *Bacteriocin Release Protein*, or BRPs (herein referred to as the generic as BRPs). The BRP employed in the invention can originate from any source known in the art including but not limited to the classical DFI3 plasmid, one of colicin B1-BP plasmids, or from colicin A, N or D plasmids. In a preferred embodiment, the BRP is of colicin DFI3 (pCDFI3 BRP).

Generally, BRPs are 45-52 amino acid peptides that are initially synthesized as precursor molecules (ProBRP) with signal sequences that are not cleaved by signal peptidases. BRP activity is thought to be mediated, at least in part, by the detergent-resistant outer membrane phospholipase A (PldA) and is usually associated with an increase in the degradation of outer membrane phospholipid. (For a general review on BRPs, see van der Wal et al., 1993, *FEBS Microbiology Review* 73:31-339). Without limitation as to mechanism, BRP mediates the preferential release of periplasmic components, although the release of cytoplasmic components is also detected to a lesser extent. When moderately overexpressed, BRP may cause the bacterial membrane to become fragile, in doing so, lysis and high release of cytoplasmic components. Additionally, it is thought that where BRP is expressed at super/high levels, the protein can cause bacterial cell lysis, thus delivering cellular contents by lytic release. In this embodiment, BRP expression may be correlated with BRP activity (e.g., release of bacterial contents). For example, super/high BRP activity results in bacterial cell lysis of substantially all bacteria. Thus, as used herein, "super/high expression" is defined as the expression level of BRP which results in bacterial cell lysis of substantially all bacteria. Moderate BRP activity, is associated with partial or enhanced release of bacterial contents as compared to a control bacteria which is not expressing BRP, without obligate lysis of the bacteria. Thus, in this embodiment, moderate overexpression of BRP is defined as the expression level at which release of cytoplasmic components is enhanced, without bacterial lysis of substantially all of the bacteria. Substantially all of the bacteria, as used herein, is more than 90% of the bacteria.

- 45 -

(153)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PC/000000000

preferably more than 70%, more preferably 80%, still more preferably more than 90% and most preferably 90-100% of bacteria.

In a specific embodiment of the invention, the BRP protein is a pC100P13 BRP mutant whose lytic function has been disrupted, thus in which release function, thereby allowing protein release without bacterial lysis (van der Wal et al., 1997, *Appl. Env. Microbiol.* 64:392-398). This embodiment allows for prolonged protein release from the bacterial vector, while reducing the need for frequent administration of the vector. In another specific embodiment, the BRP of the invention is a pC100P13 BRP with a structural C-terminal, which in addition to protein release causes cell lysis (Lorenz et al., 1998, *J. Bacteriol.* 177:2673-2679).

In another embodiment of the invention, the released release protein comprises overexpression of a pore protein, e.g., Sugawara, E. and Nakada, H., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:2607-2611.

In certain embodiments where a BRP is expressed by the bacterial vector of the invention, the BRP may be co-expressed to the specific attenuated tumor-targeted bacteria or it may be exogenous (e.g., encoded by a nucleic acid that is not native to the attenuated tumor-targeted bacteria). A BRP may be encoded by a nucleic acid comprising a plasmid, or by a nucleic acid which is integrated into the genome of the attenuated tumor-targeted bacteria. A BRP may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a primary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. A BRP may be encoded by the same nucleic acid or plasmid that encodes a secondary effector molecule, or by a separate nucleic acid or plasmid. In one embodiment, the BRP-like protein is expressed in a cell which also expresses a fusion protein comprising an effector molecule fused to an Omp-like protein. In this embodiment, the co-expression of the BRP allows for enhanced release of the fusion protein.

In a preferred specific embodiment of the invention a BRP encoding nucleic acid is encoded by a colicin plasmid. In another specific embodiment of the invention, the BRP encoding nucleic acid is expressed under the control of the native BRP promoter, which is an SOS promoter that responds to stress (e.g., conditions that lead to DNA damage such as UV light) in its natural host (for BRP, *Escherichia coli*), yet is partially constitutive in *Salmonella*. In a preferred embodiment, the BRP encoding nucleic acid is expressed under the control of the papT promoter, which is induced to respond to the osmotic nature of the tumor environment (see e.g., Lombardo et al., 1997, *J. Bacteriol.* 179:1509-1517).

Alternatively, the promoter can be an antibiotic-resistant promoter, such as the tet promoter of the Tetracycline. In a preferred embodiment, the tet promoter is a tetracycline, which regulates response in an all-or-nothing manner to the presence of tetracycline or analogs thereof such as doxycycline and analogs thereof and provides a

(154)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

BACKGROUND

CYCLOSPORIN

generally stable on-off switch. In another embodiment, the promoter is inducible, for example three-fold. Such a switch responds in a graded manner to the presence of tetracycline and provides a more sophisticated system for control of effector molecule levels. Promoter activity would then be induced by administering to a subject who has been treated with the attenuated tumor-targeted bacteria of the invention an appropriate dose of tetracycline. Although the first inducible expression system was initially described for eukaryotic systems such as *Leishmania* (Pavlat and Gull, 1992, *Current Genetics* 21:345-349) and mammalian cells (Long and Ponglik, 1996, *Cancer* 163:169-171), recent studies exemplify applicability in bacterial cells. For example, Singer et al. (1999, *Cancer* 276:263-264) have shown 50-fold induction of the *luciferase* gene upon tet induction when operably linked to the tet promoter. An advantage of this promoter is that it is induced at very low levels of tetracycline, approximately 1/10th of the dosage required for antibiotic activity.

5.4. DERIVATIVES AND ANALOGS

The invention further encompasses bacterial vectors that are modified to encode or deliver a derivative, including but not limited to a fragment, analog, or variant of a primary and/or secondary effector molecule, or a peptide acid encoding the same. The derivative, peptide or variant is functionally active, e.g., capable of exhibiting one or more functional activities associated with a full-length, wild-type effector molecule. As one example, such derivatives, analogs or variants which have the desired therapeutic properties can be used to inhibit tumor growth or the spread of tumor cells (metastasis). Derivatives or analogs of an effector molecule can be tested for the desired activity by procedures known in the art, including those described herein.

In particular, variants can be made by attaching amino nucleic acids encoding sequences by substitution, additions (e.g., insertions) or deletions that provide molecules having the same or increased anti-tumor function relative to the wild-type effector molecule. For example, the variants of the invention include, but are not limited to, those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of an effector molecule, including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change, i.e., the altered sequence has or has not conservative substitutions.

Any of the primary or secondary effector-encoding nucleic acids that are of mammalian origin can be altered to employ bacterial codon usage by methods known in the art. Preferred codon usage is exemplified in *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. New York, and Ziegler et al., 1991, *Cancer* 105:61-72.

(155)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PCY000000000

is a specific nucleotide, a derivative, analog or variant of a primary or secondary molecule comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the nucleotide sequence encoding the primary or secondary molecule, or fragments thereof under stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 6x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45 °C followed by one or more washes in 0.2xSSC/0.1 % SDS at about 24-65 °C, under highly stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound nucleic acid in 6xSSC at about 45 °C followed by one or more washes in 0.1xSSC/0.2% SDS at about 48 °C, or under other stringent hybridization conditions which are known to those of skill in the art (see, for example, Sambrook, E.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

Derivatives or analogs of a primary or secondary effector molecule include but are not limited to those molecules comprising regions that are substantially homologous to the primary or secondary effector molecule or fragments thereof (e.g., in various embodiments, at least 65% or 75% or 80% or 90% or 95% identity over an amino acid sequence of identical size without any insertions or deletions or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art) or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to an effector nucleic acid/protein effector molecule encoding sequence, under high stringency, moderate stringency, or low stringency conditions.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acids, e.g., between the sequences of a primary effector molecule and other known sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in the sequence of a first amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment with a second amino or nucleic acid sequence). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position. The percent identity between two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences ((# identical positions/total # of positions (e.g., overlapping positions) x 100). In one embodiment, the two sequences are the same length.

The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3873-3877. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul, et al., 1990, *J. Mol.*

• 45 •

(156)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/23247

PCXCBB0123247

Biol. 215:403-410. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST
 program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to a
 nucleic acid sequences of the invention. BLAST protein searches can be performed with
 the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain protein sequences
 homologous to a protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for
 comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, 1997,
 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an
 iterated search which detects distant relationships between molecules (34). When utilizing
 BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective
 programs (e.g., NBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
 Another preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the
 comparison of sequences is the algorithm of Myers and Miller, CABIOS (1989). Such an
 algorithm is incorporated into the ALIGN program (version 2.0) which is part of the GCG
 sequence alignment software package. When utilizing the ALIGN program for comparing
 amino acid sequences, a PAM10 weight residue table, a gap length penalty of 12, and a
 gap penalty of 4 can be used. Additional algorithms for sequence analysis are known in the
 art and include ADVANCE and ADAM as described in Needle and Robotti, 1994,
 Comput. Appl. Biol., 10:3-5, and FASTA described in Pearson and Lipman, 1988, Proc.
 Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Within FASTA, *skip* is a control option that sets the sensitivity
 and speed of the search. If *skip*=0, similar regions in the two sequences being compared
 are found by looking at pairs of aligned residues. If *skip*=1, single aligned amino acids are
 examined. *skip* can be set to 2 or 1 for protein sequences, or from 1 to 6 for DNA
 sequences. The default *skip* is not specified is 2 for proteins and 6 for DNA. For a
 further description of FASTA parameters, see
<http://bioweb.gatech.edu/bioweb/infomail/infomail.html>, the contents of which are
 incorporated herein by reference.

Alternatively, protein sequence alignment may be carried out using the
 CLUSTAL W algorithm, as described by Higgins *et al.*, 1994, Methods Enzymol. 264:383-
 402.

The percent identity between two sequences can be determined using techniques
 similar to those described above, with or without allowing gaps. In calculating percent
 identity, only exact matches are counted.

A primary effector molecule or a secondary effector molecule, or derivatives, or
 analogs thereof can be produced by various methods known in the art. The manipulations
 which result in their production can occur at the nucleic acid or protein level. For example,
 a cloned effector molecule encoding sequence encoding, for example, an effector
 molecule can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook *et al.*,
 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory

- 49 -

(157)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PCT/JP00/00000

from Cold Spring Harbor, New York). The sequence can be observed at appropriate sites with restriction endonucleases, followed by further enzymatic modification as desired, isolated, and ligated *in vitro*. In the production of a modified effector molecule encoding a derivative or analog of a primary or secondary effector molecule, care should be taken to ensure that the modified effector molecule encoding sequence remains within the same translational reading frame as the native protein, uninterrupted by translational stop signals. In the effector molecule encoding sequence regions where the desired primary or secondary effector molecule activity is encoded.

Additionally, a nucleic acid sequence encoding an effector molecule can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy base-pairing, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or to form new restriction endonuclease sites or destroy preexisting ones, to facilitate further *in vivo* modification. In a preferred specific embodiment, an effector molecule-encoding nucleic acid sequence is mutated, for example, to produce a transposon variant. Any technique for mutagenesis known in the art can be used, including but not limited to, chemical mutagenesis, *in vitro* site-directed mutagenesis (Ochalski *et al.*, 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551), use of TAP® ligases (Pharmacia), PCR with primers containing a mutation, etc. In a preferred embodiment, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues of an effector molecule. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a side chain with a similar charge. Families of amino acid residues having side chains with similar charges have been defined by the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, asparagine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), hydroxy acid side chains (e.g., serine, threonine, tyrosine), and aromatic side chains (e.g., phenylalanine, tyrosine, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed and the activity of the protein can be determined.

In other embodiments, the effector molecules or fusion proteins of the invention are constructed to contain a protease cleavage site.

35 5.5. FUSION PROTEINS

In certain embodiments, the invention provides a primary or secondary effector molecule which is engineered as a fusion protein (e.g., covalently bonded to a different

- 28 -

(158)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PCY/US000000000

protein). The invention provides nucleic acids encoding such fusion proteins. In certain other embodiments of the invention, the nucleic acid encoding a fusion protein of the invention is operably linked to an appropriate promoter.

In a specific embodiment, an effector molecule is constructed as a chimeric or fusion protein comprising an effector molecule or fragment thereof (preferably consisting of at least a domain or motif of the effector molecule, or at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, at least 75, or at least 100 amino acids of the effector molecule) joined at its amino- or carboxy-terminus via a peptide bond to an amino acid sequence of a different protein. In specific embodiments, fusion compositions at least 2, at least 4, at least 10, at least 20, at least 30, at least 50, at least 75, or at least 100 contiguous amino acids of a heterologous polypeptide or fragment thereof that is functionally active. In one embodiment, such a fusion protein or chimeric protein is produced by recombinant expression of a nucleic acid encoding the primary effector molecule (e.g., a TNS-encoding sequence, an anti-hepatogenic factor-encoding sequence, a tumor inhibitory enzyme-encoding sequence, or a cytotoxic polypeptide-encoding sequence) joined in-frame to a coding sequence for a different protein. Such a chimeric product can be made by fusing the appropriate nucleic acid sequences encoding the desired amino acid sequences to each other by methods known in the art, in the proper coding frame, and expressing the chimeric product from the expression vehicle of choice by methods commonly known in the art. Chimeric nucleic acids comprising portions of a nucleic acid encoding an effector molecule fused to any heterologous polypeptide-encoding sequence may be constructed. A specific embodiment relates to a chimeric protein comprising a fragment of a primary or secondary effector molecule of at least 5, at least 10, at least 25, at least 50, or at least 100 amino acids, or a fragment that displays one or more functional activities of the full-length primary or secondary effector molecule.

In a specific embodiment, a fusion protein comprises an effector tag, such as a localization tag, or other affixing tag that may be used in purification, isolation, identification, or assay of expression. In another specific embodiment, a fusion protein comprises a protease cleavage site such as a metal protease or serine cleavage site. In this embodiment, it is in some cases preferred that a protease site corresponding to a protease which is active at the site of a tumor is constructed into a fusion protein of the invention. In certain embodiments, an effector molecule is constructed as a fusion protein to an Omp-like protein, or fragment thereof (e.g., signal sequence, leader sequence, periplasmic region, transmembrane domain, multiple transmembrane domains, or coiled-coils thereof; see *infra*, Section 3.1 for definition of "Omp-like protein").

In a preferred embodiment, an effector molecule (primary or secondary) of the invention is expressed as a fusion protein with an outer membrane protein (Omp-like protein). Bacterial outer membrane proteins are integral membrane proteins of the

- 5 -

(159)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/02877

PCT/JP99/03222

bacterial outer membrane, possess multiple membrane-spanning domains and are often attached to one or more lipid moieties. Outer membrane proteins are initially expressed in precursor form (the pre-Omp) with an amino terminal signal peptide that directs the protein to the membrane, upon which the signal peptide is cleaved by a signal peptidase to produce the mature protein. In one embodiment, an effector molecule is constructed as a fusion protein with an Omp-like protein. In this embodiment, the potency of the effector molecule has enhanced delivery to the outer membrane of the bacteria. Without intending to be limiting as to mechanisms, the Omp-like protein is believed by the inventors to act as an anchor or tether for the effector molecule to the outer membrane, or serves to localize the protein to the bacterial outer membrane. In one embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used to enhance localization of an effector molecule to the periplasm. In another embodiment, the fusion of an effector molecule to an Omp-like protein is used to enhance release of an effector molecule. In specific embodiments, the Omp-like protein is at least a portion of OmpA, OmpB, OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, OmpG, a porin-like protein, PhoA, PhoB, IamB, β -lactamase, an enterotoxin, protein A, endoglucanase, peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL), PmpA, PmpB, NmpA, NmpB, PmpC, or a major outer membrane lipoprotein (such as LPP), etc. In certain embodiments of the invention, the signal sequence is constructed to be more hydrophobic (e.g., by the insertion or replacement of amino acids within the signal sequence so hydrophobic amino acids, e.g., leucine). As illustrative examples, see Figures 1-7A, *infra*.

In other embodiments of the invention, a fusion protein of the invention comprises a proteolytic cleavage site. The proteolytic cleavage site may be endogenous to the effector molecule or endogenous to the Omp-like protein, or the proteolytic cleavage site may be constructed into the fusion protein. In certain specific embodiments, the Omp-like protein of the invention is a hybrid Omp containing essential elements that originate from separate proteins.

In an exemplary mode of the invention, the Omp-like protein is OmpA; the same principles used to the construction of OmpA-like fusion proteins are applied to other Omp fusion proteins, keeping in mind the structural configuration of the specific Omp-like protein.

For example, the native OmpA protein consists of eight anti-parallel transmembrane α -strands within the 170 amino acid N-terminal domain of the protein. Between each pair of transmembrane domains is an extracellular or intracellular loop, depending on the direction of insertion of the transmembrane domain. The C-terminal domain consists of 158 amino acids which are located intracellularly and presumably contact the peptidoglycan occupying the periplasmic space. Synthetic vectors have been generated that facilitate the generation of OmpA fusion proteins. For example, Robson et al. (1995, Dev. Biol. Stand. 84:255-262) have developed vectors containing the OmpA open reading

- 52 -

FOR TRANSMISSION USE

3

14

13

2

3

31

(151)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Abstract

EC300000000000

of the Oxy-like protein to be fused to an effector molecule will depend upon the location that is desired for the expression of the effector molecule (e.g., periplasmic, cytoplasmic, membrane bound, etc.). Such fusion protein constructions as described herein for primary effector molecules are also appropriate for secondary effector molecules.

In a preferred embodiment, an effector molecule is fused to a fatty peptide. Fatty peptides used in fusion proteins have been shown to facilitate the delivery of a polypeptide or peptide of interest to virtually any cell within diffusion limits of its production or introduction (see, e.g., Bayley, 1999, *Nature Biotechnology* 17:1066-1069; Fernandez *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:415-420; and Doolittle *et al.*, 1998, *Trends Cell Biol.* 8:34-37). Accordingly, engineering attenuated tumor-targeted bacteria to express fusion proteins comprising a fatty peptide and an effector molecule enhances the ability of an effector molecule to be internalized by tumor cells. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express a nucleic acid molecule encoding a fusion protein comprising a fatty peptide and an effector molecule. In another embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with these embodiments, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule. Examples of fatty peptides include, but are not limited to, peptides derived from the HIV TAT protein, the aminoglycoside tunneling sequence (ATTS), herpes simplex virus VP22, polyhistidine (e.g., hexahistidine; 6H), polylysine (e.g., heptalysine; 7K), and polyarginine (e.g., heptaarginine; 7R) (see, e.g., Bloor *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8437-8442).

In another preferred embodiment, a fusion protein comprises a signal peptide, fatty peptide and an effector molecule. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with this method, the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

In another preferred embodiment, a fusion protein comprises a signal peptide, a proteolytic cleavage site, a fatty peptide and an effector molecule to a solid tumor by attenuated tumor-targeted bacteria. In a specific embodiment, attenuated tumor-targeted bacteria are engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins comprising a signal sequence, a proteolytic cleavage site, a fatty peptide and an effector molecule. In accordance with this embodiment, the effector molecule may be a primary or secondary effector molecule.

By way of non-limiting example, cell entry may be enhanced by addition of internalizing peptides derived from HIV TAT, herpes simplex virus VP22, aminoglycoside,

- 54 -

(152)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/25377

PCT/JP00/03262

GH, GK, and GL. The fusion can be either C-terminal, N-terminal, or internal. Internal fusion is especially preferred where the fusion follows the N-terminal signal sequence cleavage peptide. The fusion protein may further originate an N-terminal signal sequence such as OmpA or a C-terminal signal sequence such as NipA.

In a preferred embodiment, an effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin. Various toxins are known to have self-delivery capability, where one portion of the toxin acts as a delivery apparatus for the second portion of the toxin. For example, Ballard *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12531-12534 demonstrated that the *Yersinia pseudotuberculosis* (PA) which mediates the entry of Yersinia factor (YF) and Yersinia factor into the cytosol of mammalian cells, is also capable of mediating entry of protein fusions to a mutated form of YF (YF-235 amino acid residues). Thus, effector molecules of the invention, except those that function outside the cell, can be fused to the YF, or other toxin systems, including, but not limited to, diphtheria toxin A chain residues 1-193 (Doms *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5337-5342), cholera toxin, verotoxin, B cell heat labile toxin (LTB), E. coli heat labile toxin (STa), enterohemorrhagic, enterotoxigenic, cytotoxic, EPEC, EHEC, enteric toxin (EAT), CNF, cytoskeletal disrupting toxin, α -hemolysin, β -hemolysin, and Shiga hemolysins (for review see, e.g., O'Brien and Holmes, 1996, *Protein toxins of Escherichia coli and Salmonella*, Cell and Molecular Biology, Neidhardt *et al.* (eds), ASM Press, Washington, D.C., pp.2786-2842). In a specific embodiment, a primary effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin. In another specific embodiment, a secondary effector molecule is fused to the delivery portion of a toxin.

Construction of fusion proteins for expression in bacteria are well known in the art and such methods are within the scope of the invention. (See, e.g., Malachuk, S., 1996, *Microbiol. Rev.* 60:512-528 which is incorporated herein by reference in its entirety).

23

5.4. MULTISUBUNIT TOXINS

The present invention provides attenuated human-targeted bacteria which have been engineered to encode one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules. The invention provides attenuated human-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a plasmid or non-replicable molecule. In a preferred embodiment of the invention, the attenuated human-targeted bacteria is *Salmonella*. When more than one effector molecule (e.g., primary or secondary) is expressed in an attenuated human-targeted bacteria, such as *Salmonella*, the effector molecules may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid molecule. The invention also provides attenuated human-targeted bacteria comprising effector molecule(s) which are encoded by a nucleic acid molecule which is integrated into the bacterial genome. Integrated effector molecule(s) may be

33

The present invention also provides a marked tumor-targeted bacteria which have been modified to encode one or more fusion proteins and, optionally, one or more effector molecules. The invention provides attenuated tumor-targeted bacteria comprising fusion proteins which are encoded by a plasmid or transfectable nucleic acid. Where more than one fusion protein and/or effector molecule (e.g., primary or secondary) is expressed in an attenuated tumor-targeted bacteria, such as *Shigella*, the fusion proteins and/or effector molecules may be encoded by the same plasmid or nucleic acid, or by more than one plasmid or nucleic acid. The invention also provides a attenuated tumor-targeted bacteria comprising fusion proteins which are encoded by a nucleic acid which is integrated into the bacterial genome. The invention also provides a nucleic acid molecule encoding a fusion protein which nucleic acid molecule is preferably linked to an appropriate promoter. The nucleic acid sequence coding for a fusion protein of the invention can be inserted into an

02/07/2017 12:57

In certain specific embodiments of the invention, the expression vehicle of the invention is a plasmid. Large numbers of suitable plasmids are known to those of skill in the art and are commercially available for generating the recombinant constructs of the present invention.

[illegible]

In specific embodiments of the invention, a plasmid encoding an effector molecule is the pT3-TNF- α plasmid, the pT3-GRP plasmid, or the pT3-GRP/TNF- α plasmid as described in Section 6 herein.

In a specific environment of the curvature, the fusion protein of the transposon flu
accesses into the periplasmic space comprising the OmpA signal sequence and the primary
effector proteins are encoded by the plasmid pMD-III-coding region, which contains the DNA
sequence containing the *ompA* signal sequence upstream of a linear sequence into which the
coding sequence for the primary effector molecule can be cloned. In a preferred specific
environment, the *ompA* sequence is located in the periplasmic space of the *E. coli* cell.
(See, Reznar-Delmar et al. (1989), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 567:252).

The present invention also provides transposon-mediated chromosomal integration of effector molecules. Any transposon plasmid known in the art may be used in the methods of the invention so long as it includes a suitable transposase gene (e.g., *traI*) and a selectable marker. For example, the invention provides a transposon plasmid comprising a transposase gene, a selectable marker, and a *lacZ* gene.

(155)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/28877

PCV08060322

In certain embodiments of the invention, the plasmid of the invention is a transposon plasmid, i.e., comprises a transposon in which the sequence encoding an effector molecule of interest is inserted. Transposon plasmids contain transposon sequences which cassette becomes integrated into the bacterial genome. Accordingly, a nucleic acid encoding an effector molecule or fusion protein thereof is inserted into the transposon cassette. Thus, a transposon insertion integrates the cassette into the bacterial genome. The coding sequence of the effector molecule can be operably linked to a promoter, or can be promoterless. In the latter case, expression of the selectable marker is driven by a promoter at the site of transposon insertion into the bacterial genome. Colonies of bacteria having a transposon insertion are screened for expression levels that meet the requirements of the invention, e.g., that express sufficient levels of cytokine to promote tumor growth, metastasis, or regression.

In certain embodiments, in addition to the transposon, the transposon plasmid comprises, outside the inverted repeats of the transposon, a transposase gene to catalyze the insertion of the transposon into the bacterial genome without being carried along with the transposon, so that bacterial strains with stable transposon insertions are generated.

Transposons to be utilized by the present invention include but are not limited to TnA, TnB, TnO and Tn3. In a preferred embodiment, the transposon plasmid is pTn3233 (ATCC) having an ampicillin resistance gene located outside the Tn3 insertion elements and the nucleic acid encoding one or more effector molecule(s) is inserted between the two Tn3 insertion elements (e.g., within the transposon cassette). Preferably, the construct is made such that additional sequences encoding other elements is inserted between the two Tn3 insertion elements. In specific embodiments, such elements may optionally include (1) a promoterless copy of a selectable marker (e.g., *lacZ*, *lacY*, etc.) for positive selection of the bacteria containing the plasmid; (2) a BFP gene; (3) a promoter for the effector molecule (such as *trc*) operably linked to the specific site encoding the one or more primary effector molecule(s) (such as TNF- α , or a fusion protein thereof, e.g., an OvaLTN- α fusion); (4) a terminator for the nucleic acid encoding the one or more effector molecule(s).

In one embodiment, after the manipulation of the plasmid as appropriate and selection of those strains having the desired construct using the ampicillin resistance properties provided by the plasmid, the antibiotic selection is removed through plasmid loss and strains having a chromosomal transposon insert are chosen for stabilizing to human subjects (e.g., by plating on selective media).

In another specific embodiment, the plasmid pT3 is used which comprises an altered target specificity transposase gene and a quinolone resistance gene, providing the coding sequences for a promoterless *serC* gene and an MCS. In another specific embodiment, the plasmid pT3-BFP is used which comprises an altered target specificity transposase gene

PROVATEMULIZEX

In a preferred embodiment, a master station is provided for selection of master nodes.

Is a preferred embodiment, a transport platform for selection of transport-mediated electrochemical interactions, comprises:

- a) a transcription gene, for transcription initiation and integration, located outside of the transposing insertion sequence (e.g., outside of the transposon cassette);
- b) a ω -type coding sequence corresponding to the selection gene deleted in the bacterial strain (e.g., secE) as well as a recovered binding site and resistance for the ω -type gene, but lacking a promoter. This sequence is preferably located immediately following the left TN10 transposon insertion sequence;
- c) optionally, between the right and left insertion sequences is a nucleic acid sequence encoding a release enhancing molecule (e.g., DQV); and
- d) a multiple cloning site (MCS) located between the right and left insertion sequences, containing unique restriction sites within the plasmid, for the incorporation of effector molecule. The MCS is preferably located immediately following the release enhancing molecule and (if used) and just before the right TN10 insertion sequence.

20 In order to avoid this, the State Department, relying on its position of official neutrality, came to the conclusion that, regarding the suitability of the good location for efficient location.

[illegible]

For example, in the construction of the reporter, the plasmid antibiotic resistance is maintained by providing a function which the bacteria, such as *Salmonella*, needs and on the basis of which these *Salmonella* having the function can be selected for in the presence of those that do not. In our experiments, the *Salmonella* of the invention is an auxotrophic mutant which has the expression plasmid providing the means or absent biosynthetic enzyme function. The *Salmonella* which carries the expression plasmid can be selected for by growing the cells on growth medium which lacks the substance that only the desired cells, i.e. those with the expression plasmid, can metabolize. In a highly preferred aspect of the embodiment, the *Salmonella* of the invention has an obligate requirement for DAP (trans-2,6-diaminopimelic acid), most preferably by deletion of the *sdh* gene. DAP is a component of the peptidoglycan present in the peptidoglycan of Gram-negative bacteria, which is required for the integrity of the bacterial cell membrane. Absence of DAP results in bacterial cell lysis resulting from the loss of outer membrane integrity. The *sdh* (fr-

negative *salicylaldol dehydrogenase* gene encodes an enzyme in the DAP biosynthetic pathway. Culture-positive bacteria which lack this gene can be grown by supplying DAP to the culture media. For example, in the expression plasmids of the invention, that carry the *ard* gene sequence operably linked to a heterologous or homologous promoter can be selected for by growing *Gram-negative* bacteria that lack *ard* activity in the absence of DAP (see, e.g., U.S. Patent No. 5,849,083 to CEFT, Inc.).

Other new and exciting selection systems are known in the art and are within the scope of the invention. For example, a selection system utilizing a pyramid comprising a single point and less stable anti-loops may be used to select for bacteria in which constructs such as plasmids.

In another embodiment, the expression vehicle is an expression vector plasmid that is selectable by tetracycline resistance, for example a pColE1 plasmid. As used herein, a colicin plasmid herein may contain a colicin toxin and an anti-colicin. The colicin toxin being more potent than the anti-toxin, such that any bacteria which loses the colicin plasmid is killed as a result of the performance of the colicin toxin. In a preferred embodiment, the colicin toxin is the large subunit of ColE5 and the anti-colicin is the small subunit of ColE2.

In other conditions of the investigation, the expression vector is a λ vector, more specifically a phageogenic λ vector. In a purified preparation, the λ vector is competent for λ infection. Further comparisons in temperature-sensitive λ expression were in λ gt10t⁺ at 30°C but not 37°C. Consequently, the bacterial host can be grown and transformed in vivo at 30°C without expression of the primary and/or secondary effector molecule which were to be toxic to the bacterial cells. Upon introduction of the bacterial strain into the subject, the λ repressor is inactivated by the host body temperature and expression of the primary effector molecule, and optionally a secondary effector molecule, is initiated.

Expression of a nucleic acid sequence encoding an effector polypeptide or fusion protein may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the effector nucleotide is expressed in a tissue transcribed with the complementary DNA molecule. For example, expression of an effector nucleotide may be controlled by any promoter/enhancer element known in the art. A promoter/enhance may be biopolymeric (i.e., synthetic) or heterologous (i.e., not synthetic). Promoters which may be used to control the expression of an effector nucleotide, e.g., a cytokine, or fusion protein in disease include, but are not limited to, prokaryotic promoters such as the β -lactamase promoter (Villa-Komarova et al., 1978; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the lac promoter (O'Donnell et al., 1963; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; Salsburg et al., 1980; 242:74-91). Other polymers encompassed by the present invention include, but are not limited to, hist, hcat, T₇, T₇, cat, hmt, P₁, lambda p₁, ori, pTAC, pL, pM, pII (delta-4), rev, tRNA, wtA, wtB, wtC, wtD, wtE, wtF, wtG, wtH, wtI, wtJ, wtK, wtL, wtM, wtN, wtO, wtP, wtQ, wtR, wtS, wtT, wtU, wtV, wtW, wtX, wtY, wtZ, wtAA, wtAB, wtAC, wtAD, wtAE, wtAF, wtAG, wtAH, wtAI, wtAJ, wtAK, wtAL, wtAM, wtAN, wtAO, wtAP, wtAQ, wtAR, wtAS, wtAT, wtAU, wtAV, wtAW, wtAX, wtAY, wtAZ, wtBA, wtBB, wtBC, wtBD, wtBE, wtBF, wtBG, wtBH, wtBI, wtBJ, wtBK, wtBL, wtBM, wtBN, wtBO, wtBP, wtBQ, wtBR, wtBS, wtBT, wtBU, wtBV, wtBW, wtBX, wtBY, wtBZ, wtCA, wtCB, wtCC, wtCD, wtCE, wtCF, wtCG, wtCH, wtCI, wtCJ, wtCK, wtCL, wtCM, wtCN, wtCO, wtCP, wtCQ, wtCR, wtCS, wtCT, wtCU, wtCV, wtCW, wtCX, wtCY, wtCZ, wtDA, wtDB, wtDC, wtDD, wtDE, wtDF, wtDG, wtDH, wtDI, wtDJ, wtDK, wtDL, wtDM, wtDN, wtDO, wtDP, wtDQ, wtDR, wtDS, wtDT, wtDU, wtDV, wtDW, wtDX, wtDY, wtDZ, wtEA, wtEB, wtEC, wtED, wtEE, wtEF, wtEG, wtEH, wtEI, wtEJ, wtEK, wtEL, wtEM, wtEN, wtEO, wtEP, wtEQ, wtER, wtES, wtET, wtEU, wtEV, wtEW, wtEX, wtEY, wtEZ, wtFA, wtFB, wtFC, wtFD, wtFE, wtFF, wtFG, wtFH, wtFI, wtFJ, wtFK, wtFL, wtFM, wtFN, wtFO, wtFP, wtFQ, wtFR, wtFS, wtFT, wtFU, wtFV, wtFW, wtFX, wtFY, wtFZ, wtGA, wtGB, wtGC, wtGD, wtGE, wtGF, wtGG, wtGH, wtGI, wtGJ, wtGK, wtGL, wtGM, wtGN, wtGO, wtGP, wtGQ, wtGR, wtGS, wtGT, wtGU, wtGV, wtGW, wtGX, wtGY, wtGZ, wtHA, wtHB, wtHC, wtHD, wtHE, wtHF, wtHG, wtHH, wtHI, wtHJ, wtHK, wtHL, wtHM, wtHN, wtHO, wtHP, wtHQ, wtHR, wtHS, wtHT, wtHU, wtHV, wtHW, wtHX, wtHY, wtHZ, wtIA, wtIB, wtIC, wtID, wtIE, wtIF, wtIG, wtIH, wtII, wtIJ, wtIK, wtIL, wtIM, wtIN, wtIO, wtIP, wtIQ, wtIR, wtIS, wtIT, wtIU, wtIV, wtIW, wtIX, wtIY, wtIZ, wtJA, wtJB, wtJC, wtJD, wtJE, wtJF, wtJG, wtJH, wtJI, wtJJ, wtJK, wtJL, wtJM, wtJN, wtJO, wtJP, wtJQ, wtJR, wtJS, wtJT, wtJU, wtJV, wtJW, wtJX, wtJY, wtJZ, wtKA, wtKB, wtKC, wtKD, wtKE, wtKF, wtKG, wtKH, wtKI, wtKJ, wtKK, wtKL, wtKM, wtKN, wtKO, wtKP, wtKQ, wtKR, wtKS, wtKT, wtKU, wtKV, wtKW, wtKX, wtKY, wtKZ, wtLA, wtLB, wtLC, wtLD, wtLE, wtLF, wtLG, wtLH, wtLI, wtLJ, wtLK, wtLL, wtLM, wtLN, wtLO, wtLP, wtLQ, wtLR, wtLS, wtLT, wtLU, wtLV, wtLW, wtLX, wtLY, wtLZ, wtMA, wtMB, wtMC, wtMD, wtME, wtMF, wtMG, wtMH, wtMI, wtMJ, wtMK, wtML, wtMM, wtMN, wtMO, wtMP, wtMQ, wtMR, wtMS, wtMT, wtMU, wtMV, wtMW, wtMX, wtMY, wtMZ, wtNA, wtNB, wtNC, wtND, wtNE, wtNF, wtNG, wtNH, wtNI, wtNJ, wtNK, wtNL, wtNM, wtNN, wtNO, wtNP, wtNQ, wtNR, wtNS, wtNT, wtNU, wtNV, wtNW, wtNX, wtNY, wtNZ, wtOA, wtOB, wtOC, wtOD, wtOE, wtOF, wtOG, wtOH, wtOI, wtOJ, wtOK, wtOL, wtOM, wtON, wtOO, wtOP, wtOQ, wtOR, wtOS, wtOT, wtOU, wtOV, wtOW, wtOX, wtOY, wtOZ, wtPA, wtPB, wtPC, wtPD, wtPE, wtPF, wtPG, wtPH, wtPI, wtPJ, wtPK, wtPL, wtPM, wtPN, wtPO, wtPP, wtPQ, wtPR, wtPS, wtPT, wtPU, wtPV, wtPW, wtPX, wtPY, wtPZ, wtQA, wtQB, wtQC, wtQD, wtQE, wtQF, wtQG, wtQH, wtQI, wtQJ, wtQK, wtQL, wtQM, wtQN, wtQO, wtQP, wtQQ, wtQR, wtQS, wtQT, wtQU, wtQV, wtQW, wtQX, wtQY, wtQZ, wtRA, wtRB, wtRC, wtRD, wtRE, wtRF, wtRG, wtRH, wtRI, wtRJ, wtRK, wtRL, wtRM, wtRN, wtRO, wtRP, wtRQ, wtRR, wtRS, wtRT, wtRU, wtRV, wtRW, wtRX, wtRY, wtRZ, wtSA, wtSB, wtSC, wtSD, wtSE, wtSF, wtSG, wtSH, wtSI, wtSJ, wtSK, wtSL, wtSM, wtSN, wtSO, wtSP, wtSQ, wtSR, wtSS, wtST, wtSU, wtSV, wtSW, wtSX, wtSY, wtSZ, wtTA, wtTB, wtTC, wtTD, wtTE, wtTF, wtTG, wtTH, wtTI, wtTJ, wtTK, wtTL, wtTM, wtTN, wtTO, wtTP, wtTQ, wtTR, wtTS, wtTT, wtTU, wtTV, wtTW, wtTX, wtTY, wtTZ, wtUA, wtUB, wtUC, wtUD, wtUE, wtUF, wtUG, wtUH, wtUI, wtUJ, wtUK, wtUL, wtUM, wtUN, wtUO, wtUP, wtUQ, wtUR, wtUS, wtUT, wtUU, wtUV, wtUW, wtUX, wtUY, wtUZ, wtVA, wtVB, wtVC, wtVD, wtVE, wtVF, wtVG, wtVH, wtVI, wtVJ, wtVK, wtVL, wtVM, wtVN, wtVO, wtVP, wtVQ, wtVR, wtVS, wtVT, wtVU, wtVV, wtVW, wtVX, wtVY, wtVZ, wtWA, wtWB, wtWC, wtWD, wtWE, wtWF, wtWG, wtWH, wtWI, wtWJ, wtWK, wtWL, wtWM, wtWN, wtWO, wtWP, wtWQ, wtWR, wtWS, wtWT, wtWU, wtWV, wtWW, wtWX, wtWY, wtWZ, wtXA, wtXB, wtXC, wtXD, wtXE, wtXF, wtXG, wtXH, wtXI, wtXJ, wtXK, wtXL, wtXM, wtXN, wtXO, wtXP, wtXQ, wtXR, wtXS, wtXT, wtXU, wtXV, wtXW, wtXX, wtXY, wtXZ, wtYA, wtYB, wtYC, wtYD, wtYE, wtYF, wtYG, wtYH, wtYI, wtYJ, wtYK, wtYL, wtYM, wtYN, wtYO, wtYP, wtYQ, wtYR, wtYS, wtYT, wtYU, wtYV, wtYW, wtYX, wtYY, wtYZ, wtZA, wtZB, wtZC, wtZD, wtZE, wtZF, wtZG, wtZH, wtZI, wtZJ, wtZK, wtZL, wtZM, wtZN, wtZO, wtZP, wtZQ, wtZR, wtZS, wtZT, wtZU, wtZV, wtZW, wtZX, wtZY, wtZZ.

PREFACE

3

24

1:

2

3

3

PREFACE

5.7. COMBINATION THERAPY

The innovation also encourages combinations of one or more anti-cancer agents and alternative tumor-targeted locators that have different sites of action. Such a combination provides an improved therapy based on the distinct action of these therapeutics, whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

(170)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

WO 01/25287

PCY/0001/03212

The present invention also includes the sequential or concomitant administration of an anti-cancer agent and engineered tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and engineered tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that are additive or synergistic.

The invention also encompasses combinations of one or more anti-cancer agents and engineered tumor-targeted bacteria engineered to express one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules and/or fusion proteins that have a different effect of action. Such a combination provides an improved therapy based on the dual action of these components whether the combination is synergistic or additive. Thus, the novel combination therapy of the present invention yields improved efficacy over either agent used as a single-agent therapy.

4.4. METHODS AND COMPOSITIONS FOR DELIVERY

The invention provides methods by which one or more primary effector molecules which may be toxic when delivered systemically to a host, can be delivered locally to tumors by an attenuated tumor-targeted bacteria with reduced toxicity to the host. In one embodiment, the primary effector molecule is useful to treat sarcomas, lymphomas, carcinomas, or other solid tumor cancers. In certain non-limiting embodiments, the effector molecule is useful for inducing local immune responses in the site of the tumor.

According to the present invention, the attenuated tumor-targeted bacterial vectors containing a nucleic acid molecule encoding one or more primary effector molecules and optionally one or more primary effector molecules are advantageously used in methods to inhibit the growth of a tumor, reduce the volume of a tumor, or prevent the spread of tumor cells in an animal, including a human patient, having a solid tumor cancer.

The present invention provides methods for delivering one or more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention also provides methods for delivering one or more primary effector molecules for the treatment of a solid tumor cancer comprising administering, to an animal in need of such treatment, a pharmaceutical composition comprising an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. In one embodiment, the primary effector molecule

Dr. VANCE

§

30

1

20

3

3

3

(172)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 01/23/99

PCT/JP99/01232

preferably human. As used herein, treatment of a solid tumor, includes but is not limited to, inhibiting tumor growth, inhibiting tumor cell proliferation, reducing tumor volume, or inhibiting the spread of tumor cells to other parts of the body (metastasis).

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention operably linked to one or more appropriate promoters. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins of the invention and one or more effector molecules operably linked to one or more appropriate promoters.

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-targeted *S. typhimurium* vector comprising one or more primary effector molecules and optionally one or more secondary effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier. The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted *S. typhimurium* comprising one or more fusion proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an attenuated tumor-targeted *S. typhimurium* vector comprising one or more fusion proteins of the invention and optionally one or more effector molecules, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In a specific embodiment the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopoeia or other generally recognized pharmacopoeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or

(173)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

NO. 00000000

NO. 00000000

vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be
 sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or
 synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil, olive oil, and the
 like. Saline is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered
 intravenously. Aqueous solutions and aqueous dispersions and glycerol solutions can also be
 employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical
 excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica
 gel, sodium stearate, glycerol monostearate, teflon, polyethylene glycol, dried skim milk,
 glycerol, propylene glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can
 also contain adjuvants or preservatives, such as pH buffering agents.
 These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsions, tablets, pills,
 capsules, powders, sustained-release formulations and the like. Oral formulations con-
 tain standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch,
 magnesium stearate, sodium metacarbonyl, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of
 suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences"
 by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the
 therapeutic agent, such as a monoclonal antibody, in purified form, together with a suitable
 amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. The
 formulation should suit the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with
 routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration
 to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in
 sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a
 suspending agent and a local anesthetic such as lignocaine to ease pain at the site of the
 injection. Usually, the ingredients are supplied either separately or mixed together in
 unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a
 hermetically sealed container such as an ampoule or cartridge indicating the quantity of
 active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed
 with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the
 composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline
 can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The amount of the pharmaceutical composition of the invention which will be
 effective in the treatment or prevention of a solid tumor cancer will depend on the nature of
 the cancer, and can be determined by standard clinical techniques. In addition, *in vitro*
 assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise
 dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and
 the responsiveness of the cancer, and should be decided according to the judgment of the
 practitioner and each patient's circumstances. However, suitable dosage ranges are

(174)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O emulsion

PCY009013342

generally from about 1.0 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg; optionally from about 1.0 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg; optionally from about 1×10^7 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg, optionally from about 1×10^1 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg, and optionally from about 1×10^2 c.f.u./kg to about 1×10^8 c.f.u./kg. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from *in vivo* or animal model test systems.

Various delivery systems are known and can be used to administer a pharmaceutical composition of the present invention. Methods of introduction include but are not limited to intradermal, intracuticular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intramuscular, intranasal, epicutaneous, and oral routes. Methods of introduction may also be parenteral (e.g., by direct administration into the area of the lesion).

The compositions may be administered by any convenient route, for example by injection or topical application. By application through epithelial or mucous membranes (e.g., oral, nasal, and buccal mucosa, etc.) and by the administration together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and subarachnoid injection; intrathecal injection may be facilitated by an intrathecal catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Parenteral administration can also be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, by injection, by means of a catheter, or by means of an applicator, said applicator being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as dialysis membranes, or films. In one embodiment, administration can be by direct injection at the site (or future site) of a malignant tumor or neoplastic or pre-neoplastic tissue.

The emulsified tumor-targeted bacteria comprising one or more primary effector molecules and optionally, one or more secondary effector molecules may be delivered in a controlled release system. The emulsified tumor-targeted bacteria containing one or more effector proteins of the invention and optionally, one or more effector molecules may also be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (see Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Tachibana *et al.*, 1989, *Surgery* 85:509; and Staudik *et al.*, 1999, *N. Engl. J. Med.* 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used (see *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1994); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Sefton and Ball (eds.), Wiley, New York (1994); Rieger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61

PX 9-0159-01; E124 E

Other controlled release systems are discussed in a review by Sanger (1979, Science 209:1527-1533) and may be used in connection with the administration of the attenuated virus-targeted bacteria comprising one or more gene therapy effectors, modulators, and antimetabolites. One or more secondary effectors (antimetabolites).

The inventors also provide a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with each container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by that agency of manufacture, use or sale for human administration.

The present review is a survey of methods for treating a solid tumor comprising administering to an animal in need thereof, a pharmaceutical composition of the invention and at least one other known cancer therapy. In a specific embodiment, an animal with a solid tumor cancer is administered a pharmaceutical composition of the invention and at least one chemotherapeutic agent. Examples of chemotherapeutic agents include, but are not limited to, cisplatin, 5-fluorouracil, irinotecan such as topoisomerase I, topoisomerase II inhibitors (e.g., Gleevec® (Gleevec®), 9-AC, and CG-7213), gemcitabine, vinorelbine, capecitabine, 5-fluorouracil (5-FU), docetaxel, vinorelbine, irinotecan, cyclophosphamide, paclitaxel, doxorubicin, mitomycin, epirubicin, etoposide, vincristine, vinorelbine, methotrexate, cyclophosphamide, carboplatin, carboplatin, thiopurine nucleoside drugs, nitazoxanone, nitazoxanone, edinecyclopent, 1-dehydroepiandrosterone, glucocorticoids, progestin, mifepristone, tamoxifen, tamoxifen, and estrogenic hormones, and estrogen.

The present invention includes the sequential or concurrent administration of pharmaceutical composition of the invention and an anti-cancer agent such as a chemotherapeutic agent. In a specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered prior to (e.g., 2 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 4 days, 6 days, 12 days, 14 days, 1 month or several months before) the administration of the anti-cancer agent. In another specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered subsequent to (e.g., 2 hours, 6 hours, 12 hours, 1 day, 4 days, 6 days, 12 days, 14 days, 1 month or several months after) the administration of an anti-cancer agent. In a specific embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered continuously with an anti-cancer agent. The invention encompasses combinations of anti-cancer agents and substituted benzyl-protected nucleosides designed to improve one or more

60747

5

y

1

2

3

3

1

- 42 -

(177)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Abstract

Background

specific pharmaceutical composition is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which a patient tissue sample is grown in culture, and exposed to or otherwise administered a pharmaceutical composition, and the effect of such composition upon the tissue sample is observed.

Pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to augment activated immune cells by contacting immune cells with a test pharmaceutical composition or a control and determining the ability of the test pharmaceutical composition to modulate (e.g., increase) the biological activity of the immune cells. The ability of a test composition to modulate the biological activity of immune cells can be assessed by detecting the expression of cytokines or antigens, detecting the proliferation of immune cells, detecting the activation of signaling molecules, detecting the effector function of immune cells, or detecting the differentiation of immune cells. Techniques known to those of skill in the art can be used for measuring these activities. For example, cellular proliferation can be assayed by ³H-thymidine incorporation assays and cytokine cell counts. Cytokine and antigen expression can be assayed, for example, by immunoassays including, but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using antibodies such as western blots, immunohisto-chemistry multiplex immunoassays, ELISA, (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, Europrecipitation assays, precipitation reactions, gel diffusion precipitation reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, fluorescent-activated assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays and FACS analysis. The activation of signaling molecules can be assayed, for example, by kinase assays and electrophoretic shift assays (EMSA). The effector function of T-cells can be measured, for example, by a ⁵¹Cr-release assay (see, e.g., Faldutao et al., 1987, *Cancer Res.* 47:3974-3979 and Starobin et al., 1993, *J. Immunotherapy* 14:332-336).

Pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to reduce tumor formation in animals suffering from cancer. Pharmaceutical compositions of the invention can also be tested for their ability to alleviate one or more symptoms associated with a solid tumor cancer. Further, pharmaceutical compositions of the invention can be tested for their ability to increase the survival period of patients suffering from a solid tumor cancer. Techniques known to those of skill in the art can be used to analyze the function of the pharmaceutical compositions of the invention in animals.

In various specific embodiments, *in vivo* assays can be carried out with representative cells of cell types involved in a solid tumor cancer, to determine if a pharmaceutical composition of the invention has a desired effect upon such cell types.

Pharmaceutical compositions of the invention for use in therapy can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to rats,

PC 940390125263

The following series of examples are presented by way of illustration and not by limitation on the scope of the invention.

The following examples demonstrate that attenuated virus-targeted bacteria, such as *S. typhimurium*, containing a fusion in acid-inducible expression of TNF family members are capable of expressing the TNF family members.

The plasmids described here serve to illustrate examples of possible combinations of the invention. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, promoters and/or restriction molecules to replace amino acids such as the *arc* promoter and/or TNP- α encoding nucleic acids may be replaced with other appropriate promoters or effector molecules by one of ordinary knowledge in the art.

For plasmid-based transient transfection of effective nucleic-acid-expressing nucleic acids using the *in vitro* promoter, the plasmid T7SP6A (commercially available from Pharmacia) or T7SP6B (commercially available from Invitrogen) was used. Both plasmids employ an *in vitro* promoter, followed by a multiple cloning site.

For plasmid-based bacterial expression of off-target nucleotide sequencing modules made using a dual λ P₆ or λ P₇ promoter, the pCE4 plasmid was constructed as follows. Plasmid pCE33 (Eden et al., 1995, Chao 87, 123-126) was sequentially digested with the restriction enzyme ClaI and blunt-ended with mung bean nucleases, followed by cleavage with the restriction enzyme BlnI. Next, the sequencing 3 kb fragment was ligated into a 2.7 kb *Sal* BamHI fragment of pUC19 (commercially available from GIBCO) to create plasmid pCL. Plasmid pCL was cleaved with restriction enzyme BlnI and blunt-ended with mung bean nucleases, followed by cleavage with restriction enzyme λ PII. The resulting 3.1 kb band was isolated. Plasmid pCE4b was partially digested with the restriction enzyme ClaI, blunt-ended with T4 DNA polymerase, followed by cleavage with λ PII. The resulting 0.6 kb band, containing the transcription start and terminator, was then ligated into the 3.1 kb pCL fragment to give plasmid pCE4c. As with TSP9A or TSP10b, pCE4c employs an *ori* gene as the start codon, followed by the TSP10b template cloning site. Growth of

(179)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO number

PCYAS00000000

bacterial harboring any plasmid containing the ΔP_1 or ΔP_2 promoter, was performed at 30°C**4.1.2. THE pTS-PTS PLASMID**

A plasmid, denoted pTS, employing transposon-mediated chromosomal integration and a facile prototrophic selection of effector nucleotide-encoding nucleic acids, was constructed as follows. The plasmid pMC2803 (conveniently available from the American Type Culture Collection (ATCC)) was cleaved with restriction enzyme *Bam* HI and the 4.8 kb band isolated. The *Shistosoma japonicum* *serC* encoding nucleic acid was isolated from *S. japonicum* strain 14023 (conveniently available from the ATCC) by PCR using a forward primer of sequence GAAAGATCTTCGGAGGATGCGAATTC (SEQ ID NO:1), and a reverse primer, of sequence

CGGTGATCGGAGCTCGAAGGCGGGAAGGATCTAAGAAATCC (SEQ ID NO:2). The PCR reaction mixture was cleaved with restriction enzymes *Bgl* II and *Sma* III, and the 1.1 kb PCR product isolated and ligated into the 4.8 pMC2803 fragment to give a plasmid, denoted pTS. A cloning site immediately 3' to the *serC* encoding nucleic acid was present for the insertion of effector nucleotide-encoding nucleic acids.

4.1.3. THE pTS-TNF- α PLASMID

A plasmid (pTS-TNF- α), for the pTS-mediated chromosomal integration of a *pro* promoter-driven human TNF- α encoding nucleic acid, was constructed as follows. Plasmid pYA3332 or the ASD plasmid pYA3274 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,800,823 to Curcio, III) with the origin of replication replaced by that of the *colE1* plasmid (see, e.g., Drenth and Melnick, 1970, Biochem 9:399-406). Plasmid pYA3332 was cleaved with restriction enzyme *Nco* I and blunt-ended with mung bean nucleases. The blunt-ended fragment was then cleaved with restriction enzyme *Bam* HI and the 3.3 kb DNA fragment was isolated. An *L. coliformis* human TNF- α encoding nucleic acid (see, Pontice et al., 1984 (Issue 3) 12-724-729; and Salzman, et al., 1986, Cancer Biotechnology 1:145-153) as depicted in FIG. 1, was then cleaved with restriction enzyme *Bam* I, blunt-ended with T4 DNA polymerase, and then observed with restriction enzyme with *Bam* II. The resulting 0.5 kb fragment was ligated into the 3.3 kb pYA3332 fragment to give plasmid pA334TNF- α . pA334TNF- α was then cleaved with restriction enzyme *Bgl* II, and the 1.1 kb fragment, encoding the *pro* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acid, and ligated into the *Bam* HI site of pTS to give plasmid pTS-TNF- α .

4.1.4. THE pTS-BRP PLASMID

A plasmid, denoted pTS-BRP, employing transposon-mediated chromosomal integration of the BRP encoding nucleic acid and a facile prototrophic selection of effector nucleotide-encoding nucleic acids, was constructed as follows. A BRP encoding nucleic

(180)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01870

PCT/US99/01870

acid was isolated from plasmid pBVI (commercially available from BioLabs, Inc., MA) by PCR using a forward primer, of sequence CCGACGGGTGACACCTGAAAATGAGAC (SEQ ID NO 5), and a reverse primer, of sequence CCGACGGGTGACACCTGAAAATGAGAC (SEQ ID NO 6), and cloned into a TOPO-TA cloning plasmid (commercially available from Invitrogen, Carlsbad, CA) to give a plasmid, denoted pBVI-P. Plasmid pBVI-P was cleaved with restriction enzymes *Xba*I and *Bam*HI, and the resulting 0.5 kb band, containing the BAP encoding nucleic acid, was ligated into the 5.9 kb *Xba*I/*Bam*HI prota-PTS fragment to give the plasmid pTS-BAP. Cloning sites both 5' and 3' to the BAP encoding nucleic acid were present for the insertion of effector molecule-encoding nucleic acids.

10

6.1.5. THE pTS-BAP-PTS- α PLASMID

A plasmid (pTS-BAP-PTS- α), for the pTS- α encoding chromosomal integration of the BAP and the promoter-driven pTS- α encoding nucleic acid, was constructed as follows. Plasmid pTS-BAP-P, described above for the construction of pTS-BAP-P, was cleaved with restriction enzymes *Xba*I and the 1.1 kb fragment, encoding the promoter-driven pTS- α encoding nucleic acid, was ligated into the *Bam*HI site of pTS-BAP-P to give plasmid pTS-BAP-PTS- α .

15

6.2. INTEGRATION OF EFFECTOR MOLECULE-ENCODING NUCLEIC ACID INTO THE *S. SOLANACEAE* HOST CHROMOSOME

20

The system described here employs a *serO*-*S. solanaceae* mutant auxotrophic for arginine or glycine, and plasmids which express nucleic acid encoding arginine or glycine. Chromosomal integration into an actively transcribed region. However, it is well known in the art that other selection markers can be used to select for chromosomal integrants, and both methods are within the scope of the invention. See, e.g., Kleckner et al., 1991, *Methods Enzymol.* 204:133-139.

25

pTS or pTS-BAP plasmids containing effector molecule-encoding nucleic acids may be introduced into *S. solanaceae* strains by a number of means well known in the art, including chemical transformation and electroporation. Following the introduction of effector molecule-encoding nucleic acids, *S. solanaceae* are grown in media containing growth medium for a minimum of 2 hours, and more preferably 6 hours or longer. Bacteria are then plated in medium capable of selecting bacteria prototrophic for arginine, e.g., M56 medium. Atlas, R.M., "Handbook of Microbiological Media," C.C. Peck, ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993. Bacteria harboring chromosomal integrations of effector molecule-encoding nucleic acids are capable of growth in the selective media. Effector molecule-encoding nucleic acid expression is then measured, as illustrated below.

30

(181)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

DESCRIPTION

TECHNOLOGY

Effector molecule-encoding nucleic acid expression may be measured by any of several methods known in the art, such as by enzymatic activity, biological activity, Northern blot analysis, or Western blot analysis.

6.2.1. DELIVERY AND EXPRESSION OF SALMONELLA-EXPRESSED TNF- α

A *lac* promoter-driven TNF- α encoding nucleic acid was inserted into the Bam HI site of pTS-BRP to give a plasmid, denoted pTS-BRP-TNF- α , as depicted above. Plasmid pTS-BRP-TNF- α was electroporated into an attenuated strain of *S. typhimurium*, strain VNP20009, (see International Publication WO 92/16233) constructed to be *serC*⁻ such that the genotype was Δ metB, Δ parC, Δ serC (FIG. 2), by standard methods known in the art. Without limitation as to mechanism, integration of the plasmid into the bacterial genome allows for activation of the *serC* encoding nucleic acid and leads to a *serC*⁺ phenotype. Accordingly, bacteria harboring a chromosomal integration of the TNF- α encoding nucleic acid were selected by plating the electroporated bacteria on M25 agar plates supplemented with streptomycin. Bacteria were further characterized for loss of ampicillin resistance, indicative of plasmid loss, and confirmed loss of plasmid-based TNF- α expression.

In order to examine and quantify TNF- α expression by the parent-targeted bacteria of the invention, *Salmonella* harboring a chromosomal integration of the TNF- α encoding nucleic acid were grown overnight, and a measured sample of the culture was used in Western blot analysis. Specifically, TNF- α expression from a representative *serC*⁺, ampicillin-sensitive clone, denoted pTS-BRP-TNF- α Clone 2, is shown in FIG. 3. Western blot analysis revealed that bacterial protein, corresponding to 3×10^6 cells of pTS-BRP-TNF- α Clone 2 bacteria (Lane 1), expressed more than 30 ng TNF- α (Lane 3), indicating expression of TNF- α at levels greater than $10 \text{ ng}/10^6$ bacteria. Therefore, the human TNF- α was successfully expressed from a chromosomally-integrated, *lac* promoter-driven, TNF- α encoding nucleic acid in *Salmonella*.

7. EXAMPLE: ATTENUATED TUMOR-TARGETED BACTERIA EXPRESSING GMPA FUSION PROTEINS

Periplasmic localization of proteins by fusion to various signal peptides is dependent on both the signal peptide and the protein. For example, proteins can be targeted to the periplasmic compartment of bacteria by fusion of a signal peptide to the amino terminus of the protein. Without limitation, periplasmic localization is believed to facilitate release of bacterial components (such as proteins) by requiring the components to traverse only a single membrane in order to be released into the surrounding environment. In contrast, cytoplasmic localization requires that the components traverse both the inner

(182)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 01/23/97

PCT/US96/01242

and other membranes of bacteria in order to be released into the surrounding environment. Further, periplasmic localization of certain proteins may aid in biological activity.

A variety of methods known in the art may be used to target an effector molecule to the invasion to the periplasm. This example demonstrates that the fusion of the *ompA* signal peptide to the amino terminus of an effector molecule such as a TNF- α , TRAIL (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand), and interleukin-2 (IL-2) results in the periplasmic localization and subsequent processing of proteins.

7.1. PROCESSING OF AN *OMP*-TNF- α FUSION PROTEIN

TNF- α expression in five different clones, expressing a plasmid-based pro-
 10 reometer-driven *ompA*-TNF- α fusion protein in *Escherichia coli*, was examined by Western blot analysis of whole cell lysate. Periplasmic localization was demonstrated by cleavage of the precursor fusion protein to mature TNF- α by signal peptidase, an enzyme located in the periplasm. In all five clones, following induction with IPTG, overexpression of TNF- α resulted in the appearance of TNF- α as a doublet migrating at approximately 20 kD (FIG. 5, lanes 6-7), corresponding to both unprocessed and processed forms. For comparison, a *Salmonella* strain harboring a chromosomally-integrated TNF- α encoding nucleic acid,
 15 expressing the mature (processed) form of TNF- α , was used as a positive control (FIG. 5, lane 5). TNF- α expression was not detected in bacteria lacking the TNF- α encoding nucleic acids (FIG. 5, lane 3).

These results demonstrated that fusion of the mature human TNF- α protein to the
 20 *E. coli* *ompA* signal peptide (as depicted in FIG. 4) resulted in periplasmic localization and processing when expressed in *E. coli*. Further, it was unknown whether overexpression of a secreted protein would be toxic to the bacterial host as a result of overwhelming the normal secretory apparatus. The present demonstration of expression of a processed
 25 *ompA*-TNF- α fusion protein indicated that the bacterial secretory apparatus was capable of accommodating the high-level expression of secreted proteins.

7.2. PROCESSING OF AN *OMP*-TRAIL FUSION PROTEIN

The ability of the *ompA* signal peptide to periplasmically localize TNF family
 30 members was extended to TRAIL (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand), another member of the TNF family. For these experiments, a pro-procater-driven TRAIL encoding nucleic acid, encoding the mature form of human TRAIL (hTRAIL), was fused to the coding sequence of the *ompA* signal peptide (as depicted in FIG. 6). Two different *ompA*/TRAIL junctions were compared, one encoding an *Xba*I site and one encoding an
 35 *Nde*I site (See FIG. 6 for *Nde*I cloning sequence). Western analysis of both types of clones is shown in FIG. 7. Using an anti-hTRAIL antibody, Western blot analysis revealed that bacteria over-expressing the *ompA*-TRAIL with the *Nde*I junction expressed both

(183)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

WO 01/23379

PCX/DB000334

expressed (26.2 kb) and unprocessed (30.2 kb) forms of hTRAIL (FIG. 7, lanes 2-4), whereas bacteria over-expressing the ompA-TRAIL with the Nde I junction expressed the processed form exclusively (FIG. 7, lanes 4-7), indicating that the Nde I junction provided more efficient processing.

These results demonstrated that fusion of the mature human TRAIL protein to the *E. coli* ompA signal peptide resulted in periplasmic localization and processing. Further, it was unknown whether overexpression of the secreted protein would be toxic to the bacterial host as a result of overwhelming the normal secretory apparatus. The present demonstration of expression of a processed ompA-TRAIL fusion protein indicated that the normal secretory apparatus was capable of accommodating the high-level expression of secreted proteins.

7.3. PROCESSING OF AN OMPA-IL-2 FUSION PROTEIN

A secondary effector molecule (IL-2) was expressed as a fusion protein. Fusion of mature (C125A) IL-2 to the wild-type OmpA signal sequence, used above for TNF- α and TRAIL, did not permit processing of IL-2. In order to examine the periplasmic localization and processing of the mature IL-2 cytokine, mature human (C125A) IL-2 was fused to a modified ompA signal peptide, denoted ompA(8L), as depicted in FIG. 8. The modified ompA signal peptide was modified by replacing amino acids 6-17 of the ompA signal with those depicted in Figure 8. Expression and processing are shown in FIG. 9 (lanes 6 and 7). Each lane represents a single clone. Results of Western blot analysis indicated that virtually complete processing was observed with the ompA(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 6 and 7).

7.4. PROCESSING OF AN OMPA-IL-2 FUSION PROTEIN

A second fusion protein was examined for periplasmic localization and processing of human IL-2, and compared with the fusion protein of Section 7.3. The expressive and processing of mature human (C125A) IL-2 fused to a modified ompA signal peptide, denoted ompA(8L), as depicted in FIG. 9 was examined. Expression and processing are shown in FIG. 9. Partial processing was observed with the synthetic ompA(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 4 and 5), whereas more complete processing was observed with the ompA(8L) signal peptide (FIG. 9, lanes 6 and 7).

These results indicate that localization and processing of IL-2 was provided by different signal peptides. The results also demonstrate that periplasmic localization of proteins by fusion to various signal peptides is dependent on both the signal peptide and the protein.

The results of the fusion protein studies indicate that a secondary effector protein of the invention, such as IL-2, can be expressed and localized to the bacterial periplasm by

(184)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/02287

PCY00001221

fusion with the protein signal peptide such as OmpA or FlhA. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, other signal sequences can be used to assure proper localization of an effector molecule can be used. As will further be apparent to one of ordinary skill in the art, other effector molecules of the invention can be substituted for the effector molecules described in the examples herein.

3

8. EXAMPLE: ANTI-TUMOR EFFICACY OF *SALMONELLA* (GENUS *SP.*) EXPRESSING THE MATURE FORM OF TNF- α

The following experiment demonstrates that an attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* containing a genetic sequence encoding a primary effector molecule (e.g., a TNF family member) can deliver the primary effector to mammalian tumors and cause a decrease in tumor volume.

The ability of TNF- α expression to increase the anti-tumor efficacy of *Salmonella typhimurium* was evaluated in a staged murine Colon 38 carcinooma model. For three experiments, 1 mm³ tumor fragments, derived from a Colon 38 tumor, were implanted into 15 C57BL/6 mice and tumors were allowed to grow to a mean size of approximately 0.3 g, at which time animals were randomly placed into the following treatment groups (n=10): 1) untreated; 2) *Salmonella typhimurium* (Dsm28, *Agar*, *over*) (parental strain); and 3) pTS-BN3-TNF- α (Clone 2 described above). Mice in each group either remained untreated or received a single intravenous injection of 1×10^8 c.f.u. of the appropriate bacterial strain.

Tumor size was measured weekly, beginning at the time of bacterial inoculation. In the group receiving attenuated tumor-targeted *Salmonella* expressing TNF- α , tumor regression was apparent by the second week following treatment, with complete regression observed in 6 of the animals within 4 weeks following treatment (FIG. 11). Tumors in the untreated group progressively increased in size, whereas tumors in the group treated with the parental *Salmonella typhimurium* (Dsm28, *Agar*, *over*) strain displayed partial regression between weeks 3-4 following treatment, after which tumors progressively increased in size (FIG. 11).

These results demonstrate that attenuated tumor-targeted *Salmonella* are able to express and deliver an effector molecule such as a TNF family member to a tumor. Such *Salmonella* are useful in the treatment of tumors and provide enhanced tumor regression results as compared to parent *Salmonella* strains which do not express the TNF family member.

The demonstration of complete tumor regression, by *Salmonella* expressing TNF- α from chromosomally-integrated nucleic acid, indicates that biologically effective expression can result from chromosomally integrated effector molecules encoding nucleic acids.

(135)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/587

PCYB0011241

9. EXAMPLE: ENHANCED DELIVERY OF NUCLEIC
ACID MOLECULES BY
BSP EXPRESSING BACTERIA

It is known to demonstrate that BSP activity could enhance the release of a plasmid from a tumor-targeted attenuated bacteria such as *Salmonella*, a plasmid-tagged attenuated *Salmonella* strain was constructed that contained BSP on a plasmid as well as a second plasmid used as a marker for release (gfp999 with AMP resistance). To assay activity of BSP, the *Salmonella* with or without BSP was grown in culture by standard methods. The resulting supernatant was then cleared of any remaining bacteria by centrifugation and filtration and the cleared supernatant was then added to competent cells and underwent a transformation reaction. These "recipient" cells were then plated onto LB agar to look for uptake of the AMP^r marker plasmid. An increase in the number of AMP^r resistant colonies with BSP would indicate that more plasmid was released into the media from strains expressing BSP. Results are summarized in Table 2 below:

Table 2

Plasmid	Average # of Amp Colonies/Transformation
pTc999 alone	125
pTc999+BSP (pSV1)	283

These results demonstrate that the presence of BSP increased the amount of any plasmid released in the media. Thus, transformation into "recipient cells" with supernatant from cells expressing BSP gave higher number of colonies. These results demonstrate that BSP enhanced release of a secondary effector molecule, which encoded a nucleic acid plasmid. Accordingly, the results show that BSP is useful for plasmid release or DNA delivery. In addition, these *Salmonella* strains that expressed BSP and were able to deliver DNA, and remained replication competent as a population.

10. EXAMPLE: BSP EXPRESSION DOES NOT IMPAIR
TUMOR-TARGETING OR TUMOR-
INHIBITING ABILITY OF ATTENUATED
TUMOR-TARGETING *Salmonella*

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria can be engineered to express BSP in conjunction with one or more effector molecules to enhance the delivery of effector molecules to tumors without inhibiting the ability of bacteria to target the tumor.

Solid tumor nodules were obtained by intramuscular injection of B16 melanoma cells in the right hind flank of C57BL/6 mice. For tumor implantation, cells were

(186)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 00000000

PCY00000000

extracted from the flask by centrifugation, washed, and resuspended in phosphate buffered saline at 2.5×10^6 cells/ml. An aliquot of 0.2 ml of the cell suspension, for a total of 5×10^6 cells/suspense, was injected on Day 0. When tumor volumes reached 150-200 mm³, approximately 10 days after implantation, the mice were randomized into three groups of ten mice and each group received a different treatment. The control group (curve #1 on FIG. 12) received 0.2mls of PBS. Another group received 0.2 ml containing 2×10^6 c.f.u./mouse of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP2009 (curve #2 on FIG. 12). The third group received 0.2 ml containing 2×10^6 c.f.u./mouse of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* comprising pSV1, a plasmid comprising the BFP gene under the control of its native promoter (curve #3 on FIG. 12). The BFP gene is SOS inducible in *E. coli*, although the inventors believe, without limitation as to mechanism, that it is particularly constitutive in *Salmonella*, producing low to moderate levels of the BFP protein, which are further enhanced by the SOS nature of the tumor environment. Mice injected with BFP-expressing VNP2009 *Salmonella* showed nearly identical anti-tumor responses to those infected with non-BFP-expressing VNP2009, indicating that the survival or tumor-targeting ability of these *Salmonella* is not altered by BFP expression, nor is their ability to inhibit tumor growth. The outcome of BFP-expression on attenuated tumor-targeted *Salmonella* is in direct contrast to the effect of the expression of secreted HSV-thymidine kinase (HSV-TK), which HSV-TK expression results in the loss of VNP2009's tumor-inhibiting abilities (Parvatek et al., 1997, Cancer Res. 57:4537-4544). Thus, the BFP system can be used to enhance the delivery of primary and/or secondary effective molecules to tumors without further modification.

12. EXAMPLE: pepT PROMOTER EXPRESSION VEHICLE

This example demonstrates the *in vitro* and *in vivo* expression of a nucleic acid molecule encoding reporter such as β -gal under the control of the pepT promoter in an adenoviral tumor-targeted biologic such as *Salmonella*.

12.1. CONSTRUCTION OF pepT-BFP-EGAL EXPRESSION PLASMIDS

The pepT promoter was cloned by PCR amplification of the region from an isolated colony of wild type *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) using the following primers:

Forward: 5'-AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC CG-3' (SEQ ID NO:15)
 Reverse: 5'-AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C-3' (SEQ ID NO:16).

The PCR conditions consisted of 1 cycle of 95°C for 5 minutes, 35 cycles of 95°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes and 1 cycle of 72°C for 10 minutes. The PCR product was cloned into the PCR 2.1 cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, California), and is referred to as PepT/PCR 2.1.

The PepT/PCR 2.1 vector was digested with *Hind*III and *Xba*I. The pepT fragment

(187)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/02329

PCY0000000000

was gel isolated and ligated into the β -gal XbaI vector digested with the same enzymes. XbaI (Temagany Genebank Bank: No. 256425) is a prokaryotic β -gal plasmid generated by cloning the β -gal open reading frame into pUC19. The resultant plasmid was called pepT-pGAL.

5 11.2. *IN VITRO* EXPRESSION OF pepT-pGAL AND MEASUREMENT OF β -GALACTIC ACTIVITY

Salmonella strains Y31435 (CC34 in FIG. 13A) for the genetic make up of the virus, see WO 96/02233) or VNP20089 (CC16 in FIG. 13A) harboring pepT-pGAL were grown under either anaerobic or aerobic conditions to an OD₆₀₀ of ~0.5-0.8. β -gal activity was measured by the method of Siego and Low (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457). The results are shown in FIG. 13A, and demonstrate approximately 14- to 24-fold induction of β -gal activity upon growth of the bacteria under anaerobic conditions.

15 11.3. *IN VIVO* EXPRESSION OF pepT-pGAL AND MEASUREMENT OF β -GALACTIC ACTIVITY

Cells of the *Salmonella* strain Y31435 harboring the pepT-pgal expression plasmid, a BFP expression plasmid (pBVP1 from BIC 101 (Vigna, California), which comprises the pCisDf13 BFP coding sequence under the control of its native promoter) or both expression plasmids were injected intravenously into tumor bearing mice. Five days post injection, tumors and livers were homogenized and bacteria were isolated to show that the presence of plasmids for pepT-pgal and/or BFP did not interfere with the ability of these bacteria to target tumors. In addition, the tumor and liver homogenates were used to measure β -gal activity to determine whether active β -gal could be measured *in vivo* and whether the pepT promoter was induced in an anaerobic tumor environment. The results, shown in FIG. 13B, indicate very high levels of pepT promoter activity in the tumor environment. There is no significant increase in liver expression of β -gal over the background level, which is thought to arise from the low activity of the pepT promoter in the aerobic liver environment and/or the low targeting of the bacterial vector to the liver.

20 12. EXAMPLE: TETRACYCLINE INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

This example demonstrates the expression of a nucleic acid molecule encoding a reporter gene such as β -gal under the control of the *tet* promoter in an attenuated, tumor-targeted bacteria such as *Salmonella*.

The *tet* promoter was cloned from a mini-TX10 transposon by PCR.

Amplification using the following primers:

Forward: 5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG T-3' (SEQ ID NO:17)
Reverse: 5'-AGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C-3' (SEQ ID NO:18)

- 60 -

(188)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/53382

PCT/US99/03241

The PCR conditions were as follows: one cycle of 95°C for 5 minutes; 35 cycles of 95°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; and one cycle of 72°C for 10 minutes.

The ~40bp PCR fragment was gel isolated and cloned into the PCR 2.1 vector (Invitrogen). The PCR2.1 vector was digested with NdeI and BamHI. The ~60bp reporter fragment was gel isolated and ligated into the promoterless β-gal vector Z'form that had been digested with the same two enzymes. The ligation mixture was transformed and the transformed bacteria were plated to tetracycline/X-gal plates. Positive colonies were isolated on the basis of their blue color. Extracts from several positive clones were made, and assayed by the method of Balgic and Low (1974, J. Mol. Biol. 83:447-457) for β-gal activity in the presence of tetracycline. One clone was isolated and assayed for β-gal expression over a range of tetracycline concentrations. The results of the assay, which demonstrate the induction of β-gal activity by tetracycline in a dose-dependent manner, are shown in FIG. 14.

13. EXAMPLE: INHIBITION OF TUMOR GROWTH BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED *SALMONELLA* EXPRESSING ENDOSTATIN

The following example demonstrates the generation of endostatin-expressing attenuated tumor-targeted *Salmonella*, and the *in vivo* efficacy of tumor treatment by such *Salmonella*.

13.1 CONSTRUCTION OF ENDOSTATIN EXPRESSION PLASMIDS

Endostatin was PCR amplified from a human placental cDNA library using the following primers:

Forward: 5'-GTG TCC ATG GGG CAC AGG CAC GGC GAC TTC CAG-3' (SEQ ID NO:19)
Reverse: 5'-ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGCT-3' (SEQ ID NO:20).

The resulting PCR product was cloned into the PCR2.1 vector (Invitrogen). Human *hifn* endostatin was PCR amplified using the above constructed plasmid as a template with the following primers:

Forward: 5'-GTG TCC ATG GCT CGG CCG GCA AGT GTC GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC CAC GGC GAC TGC-3' (SEQ ID NO:21)
Reverse: 5'-GTG CCG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGC TG-3' (SEQ ID NO:22).

The conditions for the PCR amplification consisted of 1 cycle of 95°C for 5 min; 30

- 81 -

(189)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD used for PCR amplification
 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, and 1 cycle of 72°C for 10 minutes.

The resulting product was a DNA fragment with NcoI (5') and XbaI (3') restriction sites encoding human histamine having the peptide sequence
 NGAPRAAVVTDRIKGGTHH (SEQ ID NO.23) at its amino terminus.

The PCR product was digested with NcoI and XbaI and the 55 bp product was gel purified and ligated into the pTc99A vector that had been previously cut with the same enzymes. The ligation reaction products were transformed into *E. coli* DH5 α and the attenuated tumor-targeted *Salmonella* strain VNP20009.

The histamine-endostatin coding sequence was also cloned into the expression vector YA3334 as a NcoI/XbaI Engineered YA3334 is for and plasmid pYA272 (Curtis III, U.S. Patent No. 5,840,483) with the origin of replication replaced by that of the ColE1 (Bazara and Hietala, 1970, Biochem 9:199-206). Plasmid DNA prepared from positive clones was isolated and transformed into the *Salmonella* strain 3324, which is VNP20009 with no mutation. This strain was generated according to the methods described in Curtis III (U.S. Patent No. 5,840,483).

13.7. *IN VITRO* EXPRESSION OF ENDOSTATIN BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED *SALMONELLA*

Different strains of *Salmonella* VNP20009 and *E. coli* DH5 α strains containing the pTc99A-histamine-endostatin plasmid were grown to mid-log phase (OD₆₀₀ ~0.6-0.8), at which point each culture was split, one half receiving 0.1 mM IPTG for induction of the promoter activity and the other half receiving no IPTG. After three further hours of growth, bacterial extracts were prepared and the expression of histamine-endostatin was confirmed by Western blot analysis with an anti-histidine antibody (Clontech, Palo Alto, California). FIGS. 13A and 13B show the results of the Western blots which demonstrate pTc99A histamine-endostatin (HmHNE) expression in *E. coli* DH5 α and *Salmonella* VNP20009, respectively. While the *in vitro* promoter shows no activity in *E. coli* in the absence of IPTG, the *in vivo* promoter is constitutively active in *Salmonella*. Histamine-endostatin is expressed as a single band of approximately 25KD, which is the predicted molecular weight for the fusion protein.

The histamine-endostatin fusion protein was similarly expressed from the YA3334 plasmid, which utilizes the *in vitro* promoter to direct expression. A protein of the predicted mass of 25 kDa was detected using the anti-histidine antibody, as shown in FIG. 13. In FIG. 16, all bacterial cultures from which the samples were derived had been induced with 0.1 mM IPTG for three hours.

(190)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SYNOPSIS

PCV08001242

13.3. EFFICACY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA EXPRESSING ENDOSTATIN ON C3H/10T1/2-CL8 ENDOMETRIAL CARCINOMA

Colon 38 tumor fragments of 2x2x2 mm³ volume were implanted subcutaneously in 9 week old female C3H/10T1/2-CL8 mice. When the mean volume reached 1000 mm³, they were removed, cut into fragments of 2x2x2 mm³. The fragments were serially passaged the further cycles and the resulting 2x2x2 mm³ fragments were implanted subcutaneously at the right flank of female C3H/10T1/2-CL8 mice. When tumor volume reached 150-200 mm³, approximately 7-8 days after implantation, the mice were randomized into six groups of ten mice and each group received a different treatment. One control group received 0.2ml of PBS. Another control group received 0.2 ml containing 1×10^6 c.f.u. of the attenuated tumor-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 carrying a control and plasmid, i.e. not and plasmid that has no insert, as described in Section 5.6, supra. The first experimental group received 0.2 ml containing 1×10^6 c.f.u. of VNP20009 expressing a luciferase-endostatin fusion protein in an end plasmid. The second experimental group received VNP20009 with the same expression construct as the first group and further expressed BFP.

FIG. 17 shows the results of these experiments, which demonstrate the efficacy of tumor inhibition by the VNP20009 strains expressing luciferase-endostatin. After 60 days of treatment, the median tumor size in these VNP20009 *Salmonella* expressing endostatin was approximately 10% of the median tumor size in control animals, and over 30% less than the median tumor size in animals treated with VNP20009 *Salmonella* harboring an empty vector. Of the surviving animals, many exhibited stable tumor growth, as indicated by weight changes in net tumor size, and one exhibited a strong regression of the tumor. Incomplete penetration or effectiveness of the treatment most likely reflects an imperfect delivery system for endostatin, in accordance with O'Reilly *et al.*'s (1997, Cell 88:277-285) finding that endostatin accumulates in inclusion bodies. The delivery system for endostatin is enhanced by the expression of BFP. BFP expression is controlled by the natural promoter, which normally shows an SOS response in bacteria. BFP expression was shown to decrease mean tumor volume to approximately 6% of the mean tumor volume of the control population. Furthermore, within the tumor populations treated with endostatin and BFP, several of the mice exhibiting striking reductions in tumor volume over time, wherein the tumor volume regressed to approximately 10% or less of the initial tumor volume. The effect of BFP is likely to be two-fold first, BFP itself may possess anti-tumor activity, and second, BFP promotes the release of periplasmic contents and so some cause the release of cytoplasmic contents, including endostatin, which prevents the protein from accumulating in inclusion bodies.

(191)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 02/01340

CCTC80011241

13.4. EFFICACY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA EXPRESSING ENDOSTATIN ON DLD1 HUMAN COLON CARCINOMA

Cultures of DLD1 cells grown in agar plates were trypsinized, washed with PBS and the cells resuspended in a suspension of 5×10^6 cells/ml in PBS. 0.1 ml aliquots of single cell suspensions, each containing 5×10^6 cells, were injected subcutaneously into the right

flanks of 9-week old male female mice (C57BL/6J from Charles River). The mice were

randomly divided into three groups of ten animals each. Two groups of 10-15 days after

injection, or when tumor volume reached 200-400 mm³.

The first group of mice was the control group, and each received an 0.3 ml injection

of PBS. The second group of mice received 0.3 ml containing 5×10^6 c.f.u. of the attenuated

non-targeted strain of *Salmonella* VNP20009 carrying a control end plasmid. The third

group of mice received 0.3 ml containing 5×10^6 c.f.u. of the attenuated tumor-targeted

strain of *Salmonella* VNP20039 carrying an end plasmid which expresses a bacterial

endothelial tissue protein and BFP. The tumors were monitored and measured twice a

week. FIG. 18 is a graphic representation of tumor volume after administration of the three

regimens, demonstrating the inhibitory effect of the tumor-targeted endostatin-expressing

attenuated tumor-targeted *Salmonella* on the growth of DLD1 human colon carcinoma.

VNP20009 carrying the empty vector pVA3332 was not able to significantly inhibit

tumor growth. However, VNP20039 expressing endostatin and BFP was able to inhibit

tumor growth. These results demonstrate that the combination of endostatin plus BFP

increases the anti-tumor effect of either the VNP20009 carrying the pVA3332 vector

(tumor 8.32%).

14. EXAMPLE: EXPRESSION OF ANTI-ANGIOGENIC FACTORS BY ATTENUATED TUMOR-TARGETED SALMONELLA

The following example shows the methodology used to engineer attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* to express the anti-angiogenic factors thrombospondin 1 (TS1), platelet factor-4 and endostatin.

14.1. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCE ENCODING THROMBOSPONDIN 1

The peptide sequence, Trp 12-40: AYRVRRLSRKNTGPRVVMYEG (SEQ ID NO:24), corresponding to the anti-angiogenic homology region (AHR) of thrombospondin (see, e.g., Patent application No. C97K-1475), was reverse engineered and codon optimized for expression in *Salmonella*, resulting in the DNA sequence:

CGG TAC CGC TGG CGC CTG TCC CAT CGC CGG AAA ACC GGC TTT AAT
CGC CTG CTG ATG TAC GAA GGC (SEQ ID NO:25). Complementary

5

50

13

2

1.

3

3

- 85 -

(193)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/3367 PCT/US99/01374
 synthesis site possible. At the 5' end a sequence coding for the processing region of OmpA and a *SpeI* restriction site were added. At the 3' end, a stop codon was added with a *BamHI* restriction site. The two oligos were annealed to generate the double stranded DNA fragment. After restriction digest the fragment was ligated into the *SpeI/BamHI* restricted vector pTrc894 to produce the plasmid pTrc894-PP4. When processed, the sequence produces the full length PP-4 (47-70) peptide.

Oligo PP4-1

5'-ggagcagcgggggggggaaagcgcgcgcgaatctgcctggacctgcagggcgccgct
 GTACAAAAAATCATCAAAAGCTCTGTGGAAGCTAA-ggagcggg' (SEQ ID
 NO:29)

Oligo PP4-2

5'-ggagcagcgggggggggaaagcgcgcgcgaatctgcctggacctgcagggcgccgct
 CAGCTTCAGGCAGATTGTGGGCGCTTggagcagcggggggggg' (SEQ ID NO:30)

(Restriction sites are italicized and the ompA processing recognition site is underlined.)

14.3. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NUCLEIC ACID SEQUENCES ENCODING A PEPIDE

The anti-hepatogenic peptide apomargin

(NYFDQDQIMTDFEWPKVIVRTGSSPHGVLLVDNYCEA
 WRTADTAVFCLASPISTFKILQCKAYSCANELIVCENSEMTDARK (SEQ ID
 NO:31); see, e.g., International Publication No. WO99/28336) corresponds to the C-
 terminus of reelin, which is a proteolytic fragment of collagen XV. Oligonucleotides

Oligo ApomarginF and oligo ApomarginR were designed to amplify the DNA fragment from
 human cDNA. At the 5' end a sequence coding for the processing region of OmpA and a
SpeI restriction site were added. At the 3' end, a stop codon was added with a *BamHI*
 restriction site.

Oligo ApomarginF: 5'-ggcgc agcgg ggagcagcggggg ATATACGCTTGTGATGCTGG-3' (SEQ
 ID NO:32)

Oligo ApomarginR: 5'-ggc agcggg TTACTTCCTAGCGTCTGTCATGAAGCTG-3' (SEQ ID
 NO:33)

(Restriction sites are italicized and the OmpA processing recognition site is underlined.)

- 26 -

(194)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/8829

PCVCE0012242

A fragment of the correct size was obtained by PCR using plasmid cDNA as template. The PCR product was cut with *SpeI*/*Bam*HI and ligated to the *SpeI*/*Bam*HI restricted vector pTet301 containing the modified *ompA* signal sequence to produce the plasmid pTet301-A_{ompA}. When processed, the sequence produces the Apomycin peptide.

14.4. ANTI-ANGIOGENIC PEPTIDES PRODUCED BY *SALMONELLA* INHIBITING ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION

pTetOmpA-Endostatin, pTet301-174 and pTet301-13,40 plasmids were electroporated into attenuated tumor-vaccines *Salmonella* VNP20009 strains. *Salmonella* strains expressing pTetOmpA-Endostatin, pTet301-174 and pTet301-13,40 were screened for anti-proliferative activity as described by Feldman *et al.*, 2000, Cancer Res. 60:1500-1505 and Blumberg *et al.*, 1999, Nature Biotech. 17:343-349. Five ml cultures of individual colonies were grown for 6 hours. Cell lysates were produced by resuspending the cell pellet in 1/20 volume HUVEC medium containing 100 mg/ml gentamycin and performing 3 consecutive freeze/thaw cycles. The lysates were cleared by centrifugation and filter sterilized using a 0.2 μ m syringe filter. Ten, twenty-five or fifty μ l of the lysates were added to human umbilical cells (HUVECs) in 96 well plates containing 100 μ l basal medium 2% FCS plus 10 ng/ml EGF. As a control *Salmonella* containing the empty pTet vector were used. Plates were incubated for 72 hours and proliferation was measured by MTT assay (Mosmann *et al.*, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

The preliminary results in FIGS. 19 and 20 show that the phages secreted peptide (pTet-2), the thrombospondin peptide 13,40 (13,40-3) and endostatin produced by *Salmonella* seem to have anti-proliferative activity between 40-60%.

15. EXAMPLE: EXPRESSION OF A BACTERIOCIN FAMILY MEMBER BY ATTENUATED *SALMONELLA*

This example demonstrates that attenuated tumor-vaccines, such as *Salmonella*, containing a nucleic acid encoding a bacteriocin family member are capable of expressing the bacteriocin family member.

15.1. CONSTRUCTION OF COLI PLASMIDS

The plasmids described herein serve to illustrate examples of specific nucleotides of the bacteriocin. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, promoter and/or effector nucleic acid-encoding nucleic acids such as the *ompA* promoter and/or bacteriocin encoding nucleic acids may be replaced with other appropriate promoter or effector molecules by methods known in the art.

(195)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 000897

PCX0503242

15.1.1. THE pLSPUT-1 LACZ INTERMEDIATE VECTOR FOR pLSPUT-1

pLSPUT-1 represents the intermediate vector used to create a cassette containing a multiple cloning site and lacZ fragment for cloning/selection into the plasmid vector ColE3-CA38 (SEQ ID NO:34). To facilitate the cloning of BRP into pLSPUT-1, BRP was first cloned into an intermediate shuttle vector (FIG. 21). This vector contains a lacZ fragment which can be used to select clones on bacteria lacking lacZ activity (e.g., *Escherichia coli* strain HB101). The BRP fragment was then cloned into the pLSPUT-1 plasmid Small site (FIG. 22) as a cassette containing the lacZ origin complementation fragment. The lacZ fragment allows insert selection possible (i.e., Lac+) on this amp. Although the opportunity occurring pLSPUT-1 has no antibiotic selection markers (FIG. 23), selection for the presence of the plasmid is possible by using a titer assay (Ongley, A.P. and Chaffey, B. "Methods for Studying Cellulose and Their Plasmids" in *Plasmids, a Practical Approach* 1987, ed. By K.G. Hardy, Glendon, L. et al. IRL Press, 357-388). This titer assay should facilitate not only the cloning of BRP into the pLSPUT-1, but any DNA that could be combined with pLSPUT-1 or pLSPUT-1. The new pLSPUT-1 plasmid was then transformed into 41.2.9 and tested for activity. Preliminary titering assays demonstrated that the presence of BRP on the plasmid did not interfere with the ability of this strain to produce B3. To determine if 41.2.9 B3/BRP had enhanced activity over 41.2.9 B3 the amount of total units of B3 produced by each strain was determined (FIG. 24). 41.2.9 B3/BRP produces 100% more total units than 41.2.9 B3 alone, demonstrating that this strain has an enhanced activity over 41.2.9 B3 alone.

15.1.2. HALO-STAIN ASSAY FOR B3 ACTIVITY

The sensitive test strain (SK522) is grown to an OD₆₀₀ of 0.5. One hundred µl of supernatant is added to 1 ml of warm (55°C) LB soft agar (for a 100:150:100 dish) and quickly poured onto an LB agar plate. The plate is rocked gently to spread the overlay evenly over the plate and the agar allowed to solidify for 10-15 minutes. Colonies of *E. coli* or *S. aureus* for which B3 activity assay is desired are isolated with a sterile toothpick and "stabbed" into the agar. The agar plates are then inverted and incubated at 37°C overnight. The following day a halo or clearing zone appears around the B3 spot as the secreted Colicin B3 kills the sensitive strain. The colonies can be further induced to increase B3 production or secretion by treatment with any of a variety of SOS-inducing agents such as an ethylenediamine agent (e.g., N-ethylmaleimide, N-ethylmaleimide or X-ray).

The results of one of the halo assays are shown in FIG. 25. When a bacterial strain secretes a colicin in the presence of a sensitive strain grown on a bacterial lawn on a petri dish, the secreted colicin diffuses out and kills the bacterial cells contained in the bacterial

(196)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/0 00/03/00

PCX0080011242

been, lysing them thus creating a clear zone or halo. The size of the halo corresponds to the amount of colicin secreted. The results shown in FIG. 25 show a number of studies. No halos are ever observed around strains not carrying the colicin-CA38 plasmid. In the presence of isolates, colicin is produced by the *Salmonella* strains. Also evident is that with various types of induction (i.e., alkylating agents, UV light, X-rays), all of the halos increase in size in a dose-dependent manner.

15.1.3. OVERLAY ASSAY FOR SELECTIVE CLONES

Transformants are plated with vectors (controls) (up to 1:10,000) onto LB and grown for 2 hours at 37°C. The sensitive indicator strain is then prepared as above in the halo assay and an overlay poured with soft agar. After allowing to solidify for 10 minutes, the plate is then inverted and incubated overnight at 37°C. Small clearing zones that appear the following day (which resemble bacterial plaque plaques) with a result overlay (or colonies) in the middle of the clearing zone.

15.1.4. "PLAQUE" OR HALO PURIFICATION ASSAY

The small colony at the center of the clearing zone in the overlay assay described above is then isolated using a sterile pasture pipette. In the case of either no visible colony or for the case of multiple colonies in one halo, the entire halo is picked with a sterile pasture pipette. The colony or halo is transferred into 100 µL of LB. Dilutions (up to 1:10,000) are made and replated on LB agar and allowed to grow for 2 hours at 37°C. An overlay is then poured with the sensitive strain as outlined above. The following day, all or most of the colonies should have halos around them.

16. EXAMPLE: ES INJECTION IN VIVO AND DETERMINATION OF THE PERCENT RETENTION OF *PhaSMO* IN *SALMONELLA*

The following example demonstrates the retention of the colicin-CA38 plasmid in *Salmonella* in vivo.

Homozygotes of tumor and liver from two mice 30 days post injection of either 41.29 (or 41.2.9E3-CA38) were used for the studies in the descriptions to follow, L=Liver, T=Tumor. All four homozygotes were plated for CFU and colonies were picked for analysis by matrix PCR and for colicin production. About four colonies of colonies similar to 41.2.9 were obtained from all homozygotes. Five colonies were picked from each for colicin and PCR analysis. An additional 30 colonies were picked from the 41.2.9 T and L plates for further analysis as these seemed to be a mixed population of colicin producers and non producers in the 41.2.9E3 liver homozygote. Based on these results, an additional 100 colonies from 41.2.9E3 tumor and liver were picked and tested for colicin production.

(197)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WDO/01/01/01

PCY/01/01/01

and mshB PCR. Distribution and phage distribution were calculated from the combined data.

The results of the B3 injection in vivo. Determination of the Percent retention of phage in Salmonella are shown below in Table 3.

Table 3

Tissue	Cell count	Tissue weight	CFU/gm	number positive for infection	% positive in mshB PCR	% phage retention
41.294	1.07E+03	1.33	4.03E+03	0/5	100%	n/a
41.291	1.26E+03	0.26	2.42E+03	0/5	100%	n/a
41.295NL	1.15E+04	2.34	2.46E+04	3/4/15	100%	64.44
41.290CT	1.08E+04	0.35	1.58E+07	134/135	100%	99.26

In order for the cells phage to have an effect in vivo, and in order for it to carry other genes to the site of the tumor in vivo, the phage phage must be effectively retained in vivo. The results obtained in this experiment were surprising and also encouraging since the target of the phage is the tumor, and therefore there would be less effect on the liver itself.

17. EXAMPLES TUMOR TARGETING OF VARIOUS 41.2.9 STRAINS IN THE M2 LONG TUMOR MODEL.

The following experiment demonstrates that the ability of 41.2.9 colE3 and 41.2.9 colE3 BFP and 41.2.9 colE3 BFP-m (modified BFP) Salmonella strains to target tumors.

The Salmonella strains listed in Table 4 below were injected into M2 long tumor-bearing animals and animals were sacrificed on Day 7. Organ weights were assayed the next day for calculation of c.f.u. Tumors and livers were homogenized and plated on media to determine the colony forming units (c.f.u.). In groups 1, 2, 4, and 6, the strains all accumulated in the tumors to approximately 4×10^8 c.f.u/g with varying accumulation in the livers ranging from 6×10^7 to 6×10^8 c.f.u/g. Table 4 summarizes the data for all groups and is represented by the average c.f.u. All strains were found to have good tumor colonization (better than 10^8 c.f.u./gram tissue) and all strains gave positive tumor to liver ratios. The BFP colE3 had the best ratio, but was not necessarily better than all other strains available. The B3 and B3BFP strains accumulate to fairly high levels in tumors with tumor to liver ratios between 100-200:1.

- 89 -

(198)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01287

PCYUS8041287

Table 4

Group	Strain	Tumor (X 5, Ave ± SE)	wt/g tissue	Ratio (Tumor/Liver)
1	41.2.9/EB	T	$5.1 \pm 1.5 \times 10^3$	13/1
1	41.2.9/EB	L	$3.5 \pm 3.6 \times 10^2$	
2	41.2.9/EB3BRP	T	$4.6 \pm 2.7 \times 10^2$	208/1
2	41.2.9/EB3BRP	L	$1.2 \pm 1.3 \times 10^2$	
3	41.2.9/EB3BRP ₂	T	$3.5 \pm 0.1 \times 10^3$	9/1
3	41.2.9/EB3BRP ₂	L	$3.9 \pm 3.4 \times 10^2$	

BRP, contains a modified BRP that contains point mutations at position 96 (C to an A mutation), an amino acid change of a serine to an aspartate and a position 114 (C to an A) resulting in an amino acid change of a serine to a threonine. The tumor BRP, the longer cancer growth but it will not to reduce mutation from the bacteria (Van der Wal, P., Koozevski, G., Ben Nijzen, C.M., Oudega, D. and Lamm, A. (1998) Optimization of Bacterial Protein (BRP)-Mediated Protein Delivery Strategies with Random Polypeptides of the pCIB1-L-Modified BRP Genetic Instability Labeling and Quantification from Protein Release, Applied and Environmental Microbiology vol. 64 pp 292-294).

18. EXAMPLE: EFFICACY OF 41.2.9/COB3 ON MURINE COLON CARCINOMA

The following example demonstrates the ability of 41.2.9/COB3 to inhibit the growth of C3H murine colon carcinoma.

Colon 39 tumor fragments (2x2x2 mm³) was implanted in C57BL/6 mice (female, Age: 9 weeks) subcutaneously. After tumor volume reached to 1,000 mm³, the tumors were removed from the mice under sterile condition and cut into small fragments (about 2x2x2 mm³ size/fragment), and repeated above procedure for 5 cycles. The fragments were implanted into mice subcutaneously on the right flank by using a tumor implantation needle on Day 0 of tumor implantation.

Mice were randomized on Day 0 of *Salmonella* administration when tumor volume reached 130-200 mm³. Protein stocks of 41.2.9 and 41.2.9/COB3 were thawed at room temperature, and diluted in PBS to a final concentration of 7.5×10^6 c.f.u./ml, respectively. Aliquots of 0.2 ml bacterial suspension (1.5×10^9 CFU/mouse) were administered intravenously into mice as group indicated on Day 0. The bacteria suspension was diluted to 1×10^5 CFU, plated on meth plates and incubated overnight to determine the number of bacterial c.f.u. which were administered. The tumors were measured twice per week up to the end of the experiment. Three tumors of each group

(199)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD01/08/07

PCY060001012

(CoE3) was dissected and processed for determining cfa and retention of plasmid.

Groups:

Groups	Mice
1. Unoperated control	18
2. 41.2.9 (1.5x10 ⁶ /mouse)	18
3. 41.2.9/CoE3 (1.5x10 ⁶ /mouse)	18

The results for the efficacy of 41.2.9/CoE3 on C38 murine colon carcinomas are shown in FIG. 26. The data demonstrate that mice treated by intravenous injection with VNP20009 (41.2.9) are able to significantly inhibit the growth of C38 murine colon carcinomas. In addition, when mice were treated with VNP20009 containing the CoE3 plasmid, tumor regression (i.e., tumors went smaller at the end of the experiment than at the beginning) was achieved.

19. EXAMPLE: ANTI-TUMOR ACTIVITY OF VNP20009/COE3 ON DLD-1 HUMAN COLON CARCINOMA IN NUDE MICE

The following example demonstrates the enhanced ability of *Salmonella* mutant VNP20009/CoE3 (41.2.9/CoE3) to inhibit the growth of DLD-1 human colon carcinoma relative to *Salmonella* mutant 41.2.9.

DLD-1 cells grown in log phase were removed by trypsinization, washed with PBS, and resuspended in 2x10⁶ cells/ml PBS. Single cell suspensions (0.1 ml) were injected into Nude mice (Ncr:NIH-CD1 female, Age 9 weeks; Don Charles River) subcutaneously on Day 0 (5 x 10⁵ cells/mouse) at right flank. Ten animals were used in each group, randomized and sized at about 18-20 days after tumor implantation, when tumor size reached 300-400mm². CFU of *Salmonella* mutant 41.2.9 and 41.2.9/CoE3 were counted one day ahead. Bacteria (41.2.9 and 41.2.9/CoE3) were diluted to 1x10⁸ CFU/ml. A loop of 0.1 ml bacterial suspension (2x10⁸ CFU/mouse) were injected intravenously into mice on days indicated. The bacteria suspension was diluted to 1x10⁸ CFU, placed on carb colonies 100ul on water plates and the plates incubated overnight. The bacteria colonies were counted next day. The tumors were measured twice per week.

Groups:

Groups	Mice
1. Unoperated control (PBS)	18
2. 41.2.9 (2x10 ⁸ /mouse)	18
3. 41.2.9/CoE3 (2x10 ⁸ /mouse)	18

The results of the anti-tumor activity of 41.2.9/CoE3 on DLD-1 human colon carcinoma in nude mice are shown in FIG. 27. The cells E3-containing 41.2.9 strain

- 92 -

(200)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

3/0000000

CYTOSOLIC

shows enhanced activity as compared to state 41.2.9 alone.

20. EXAMPLE: EFFICACY OF 41.2.9/COLE3 ON B16 MURINE MELANOMA IN C57BL/6 MICE

The following example demonstrates the ability of *Salmonella* mutant 41.2.9/COLE3 to inhibit the growth of B16-F10 melanoma.

B16-F10 cells grown in 100 plates were recovered by trypsinization, washed with PBS, and resuspended in 5×10^6 cells/ml PBS. Single cell suspensions (0.1 ml) were injected into C57BL/6 mice (female, Age: 9 weeks) subcutaneously on Day 0 (5×10^4 cells/mouse) at right flank. Ten animals were used in each group, and randomized at day 9, when tumor volume reached 150-200 mm³. Fresh stocks of *Salmonella* strains 41.2.9 and 41.2.9/COLE3 were thawed at room temperature, and diluted in PBS to a final concentration of 7.5×10^8 c.f.u./ml, respectively. Aliquots of 0.2 ml bacterial suspension (1.5×10^8 C.F.U./mouse) were administered immediately into mice as group initiated on Day 9. The bacterial suspensions were diluted to 1×10^8 C.F.U., plated on nutrient agar and incubated overnight to determine the number of bacterial cells which were administered. The tumors were measured twice per week up to the end of the experiment.

Groups:

			Mice
1.	Unresected control		10
2.	41.2.9 (1.5x10 ⁸ C.F.U./mouse)		10
3.	41.2.9/COLE3 (1.5x10 ⁸ C.F.U./mouse)		10

The results of the efficacy of 41.2.9/COLE3 on B16 murine melanoma in C57BL/6 mice are shown in FIG. 20. The data demonstrate that mice treated by subcutaneous injection with 41.2.9 (41.2.9) are able to significantly inhibit the growth of B16 murine melanoma. In addition, mice treated with 41.2.9/COLE3 showed a significant decrease in tumor size at early time points (up to day 27) compared to 41.2.9 alone. This finding is very important because smaller tumor sizes are more readily susceptible to other therapeutic (e.g., chemotherapeutic agents and radiation such as x-rays).

21. EXAMPLE: ANTI-TUMOR EFFICACY OF 41.2.9/COLE3 COMBINED WITH BFP

The following example demonstrates that the coexpression of BFP and U3 in *Salmonella* mutant 41.2.9 increases the anti-tumor efficacy of co-inoculation.

The coexpression of BFP and U3 in *Salmonella* mutant 41.2.9 increases the amount of BFP secreted from the bacteria *in vivo*. If BFP was able to increase the amount of BFP secreted from the *Salmonella* *in vivo* then it could be hypothesized that this

- 93 -

(201)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01879

PCY000011242

additional extracellular E3 would be readily available to the tumor cells and thus increase the cytotoxicity to these cells. In this experiment a groups of animals (10 animals per group) were tested:

Group number	Treatment
1	Control (no treatment)
2	4 L2.9
3	4 L2.9/E3
4	4 L2.9/E3/BRP

The model used in this experiment was the human lung carcinoma line H1975. The cells were implanted into the flank of mice subcutaneously on day 1. When the tumors reached to approximately 50mm³, on day 14 the animals were injected by intravenous injection with 10^6 cells of the virus described in the above table, or with saline in the case of group 1. The tumor volume was measured weekly up to day 24. The results in Table 5 show that while 4 L2.9 by itself is able to inhibit tumor growth (40% inhibition), the combination with E3 is able to increase the anti-tumor efficacy (63%). However, when the virus carrying both E3 and BRP is used in this model, the anti-tumor efficacy is further enhanced (67% inhibition compared to untreated control) and the enhanced inhibition is quite significant at the earlier time points (Table 5).

Table 5: Percent Tumor Growth Inhibition Compared to Untreated Control

Group	Day 17	Day 20	Day 23
1 (Control)	50	38	40
2 (4 L2.9)	63	58	63
4 (4 L2.9/E3/BRP)	97	82	62

In conclusion, treatment with Adenovirus carrying both the cytotoxic colicin E3 and the enhanced secretion system BRP results in an increase in anti-tumor efficacy compared to the untreated control and to treatment with 4 L2.9/03 alone.

22. EXAMPLE: COMBINATION OF COLICIN E3-CONTAINING SALMONELLA WITH X-RAY TREATMENT

The following example demonstrates that the combination of 4 L2.9 with two doses of X-ray significantly increases the survival time of mice above that seen for X-ray alone.

The schedule was as follows: At day 0, tumors were implanted by the administration of B16F10 melanoma (5×10^6 cells/mouse) i.e. in the right side, at mid body of B6 C57B6 female mice (5-7 wks of age). At day 5, colicin E3-containing Salmonella 4 L2.9 was injected and on days 12, and 26, x-rays were administered.

- 94 -

(202)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01110

PCV0000000000

The results of the combination of Fc γ RIII-E3-covalently bound to anti-CD3 antibody with X-ray treatment are shown in Table 6.

Table 6

Category	n(%)	Days to lg	Mean	SD
A alone 15Gy	(6)	12, 12, 18, 18, 18, 21	17	1.0
B 15Gy + X-ray 12Gy, 26Gy	(9)	14, 14, 18, 21, 25, 35, 35, 67	33	1.9
C 41.2.9 + 15Gy X-ray 12Gy, 26Gy regression #1,2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 60, 67	47	2.8
D 41.2.9/E3 + 15Gy X-ray 12Gy, 26Gy regression #1,2	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74	57	3.3

15 The data demonstrates that the combination of 41.2.9 with two doses of X-ray significantly increases the survival time of mice above that seen for X-ray alone. E3 further increased the survival time of mice above that seen for 41.2.9 plus X-ray.

20 23. EXAMPLE: EXPRESSION OF CYTOTOXIC NECROTIC FACTORS BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that the expression of *E. coli* cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1) by tumor-targeted bacteria.

Cytotoxic necrotic factors include, but are not limited to, *E. coli* cytotoxic necrotic factor 1 (CNF1; Palva et al., 1993, Infect. Immun. 61:4904-4914), *Yersinia enterocolitica* CNF1 (Lin et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Comm. 250:461-465) and *E. coli* cytotoxic necrotic factor 2 (CNF2; Sugai et al., 1999, Infect. Immun. 67:6350-6357). The CNF family also includes *Yersinia enterocolitica* CNF1 (YCNF1) which shares 27% identical residues and 30% conserved residues of the C-terminal portion of CNF2 (Oswald et al., 1994, Proc. Acad. Sci. USA 91:3814-3818).

30 CNF1 was cloned from *E. coli* J56 (ATCC 700316) by PCR using the primers (forward) 5'-GTGCACTGAAATGGGTAACCAATGGCAAC-3' (SEQ ID NO:35) and (reverse) 5'-CAGCAGAGCTGCTTAACTAAACACACACAGGGAG-3' (SEQ ID NO:36) using standard PCR. An approximately 3100 bp product was obtained and cloned into the NotI and SacI sites of pTet55a for expression of the protein as well as DNA

35 sequencing using *E. coli* as the DNA cloning host. DNA sequencing was performed by standard methods at the Yale University School of Microbiology laboratory. The DNA

-35-

(203)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/01107

PCV0800000000

sequencing confirmed that the cloned PCR product was CNP1 with only minor sequence variations of 6 of 3955 base pairs.

The CNP1 plasmid was electroporated into an *E. coli* DNA cloning host DH5 α and *Salmonella* strain Y81646 (Genbank Publication No. WO 99/13053). The expression of CNP1 was determined in the *E. coli* DNA cloning host *Salmonella* strain Y81649 using a standard LDH assay (Promega, Madison, WI, Catalog #60). FIG. 29 shows that the presence of the CNP1-expressing plasmid results in enhanced cytotoxicity. A subsequent assay was used to show that *Salmonella* carrying the CNP1-expressing plasmid also exhibit other known properties of CNP1 such as autoantigenicity (Kysile et al., 1970, J. Clin. Microbiol. 23: 694-699). Bile cells exposed to CNP1 were examined for nuclei by light microscopy. The results in FIG. 30 clearly show that the presence of CNP1 in *Salmonella* results in the expected autoantigenicity and cell enlargement.

24. EXAMPLE: EXPRESSION OF VEROTOXIN BY SHIGA-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates the cytotoxicity of verotoxin AB produced by toxin-targeted bacteria engineered to express verotoxin AB.

Verotoxin (syn. HSC19 toxin, Shiga toxin, shiga-like toxin, Shiga-like toxin). This toxin was isolated from a colicin-producing *E. coli* strain HSC10, and was originally thought to be a colicin (Packer-Hirshley et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82(15):6996-7000). It has a long history of mutagenic activity, especially for ovarian cancer and leukemia. However, the antitumor activity is associated with purified preparations, not with whole live bacteria.

Verotoxin was obtained from *E. coli* HSC10 (ATCC 35227) using primers based upon the published sequence for verotoxin, I and confirmed by DNA sequencing at the Yale Keck Biotechnology Center using standard DNA sequencing techniques. The expression of verotoxin was accomplished using the BFP gene under control of the tetracycline-inducible promoter polycomb with the verotoxin A and B subunits. The tetracycline-inducible BFP verotoxin AB was cloned into a vector for chromosomal integration using the *melB* gene.

24.1. CONSTRUCTION OF VECTORS

24.1.1. AMPLIFICATION AND CLONING OF AB

Verotoxin AB (AB) was generated by PCR using the following primers:

H19B22 Forward: 5'-GTGTCATGGCTAAACATTATTAATAGCTTCATGTC-3'
(SEQ ID NO:37); and

(204)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD000000

CTC000000

Q576-R1: reverse 5'-ATGCTGACAGAACTGACTGAATTGAGATG-3' (SEQ ID NO 38)

These primers also contain overhang (5') and PstI(3') restriction endonuclease sites for cloning into the NcoI and PstI sites of pCR99A.

3

24.1.3. AMPLIFICATION AND CLONING OF TETRBP

TetBP-AB was constructed in the intermediate vector pSP72-TetBP. TetBP was generated by PCR using the following primers: Tet-F1 forward 5'-CTGTAGATCTTTAAGACCACTTTCACATTAAAGTTC-3' (SEQ ID NO 39) and BRP-T51-R1 reverse 5'-CACAGGATCTCTACTGAACGGCGATCCCG-3' (SEQ ID NO 40). These primers contain BglII(5') and BamHI(3') restriction endonuclease sites for cloning into BglII and BamHI sites of pSP72-TetBP vector.

18

24.1.3. SUBCLONING OF AB INTO pSP72-TetBP

pCR99A-AB was digested with BsaRI and AclI restriction endonucleases to remove AB for insertion into pSP72-TetBP. TetBP, also digested with BsaRI and AclI restriction endonucleases. The pSP72-TetBP vector contains multiple restriction endonuclease sites for cloning in addition to a portion of the β -gal gene for lacZ-alpha complementation in yeast. Both the vector (pSP72-TetBP) and the AB insert were resolved on 0.8% X-TAE agarose gel and purified using the Qiagen gel extraction kit. The vector and insert were ligated using T4 ligase and transformed into DH5E *E. coli* cells using the heat shock method. The cells were plated to LB plates containing 100 μ g/ml Amp and 40 μ g/ml X-gal. Positive colonies were selected based on ampicillin resistance and the presence of a functional β -gal gene (positive colonies were blue).

20

23

24.1.4. SUBCLONING OF TETRBP-AB INTO pCVD42

pSP72-TetBP-AB was digested with NcoI and BglI restriction endonucleases for subcloning into the pCVD42 vector, also digested with NcoI and BglI restriction endonucleases.

30

24.1.5. *malB* CHROMOSOMAL VECTOR

A vector capable of undergoing homologous recombination with the *DnaB* gene in the chromosomes of strain VNR26009 (aka. YS1646 in International Publication No. WO 99/13033) was constructed in the suicide vector pCVD42 (Dong et al., 1991). Infectious and noninfectious 59-63 kb-53 kb fragments for PCR were designed that would generate portions of the 5' and 3' sections of the *malB* deletion consisting in VNR26009 on two separate products (malB-5'). Forward 5'-GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG

33

(205)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD0101217

PCVD000001217

CCG TTA ACC CTC TGA CCA (SEQ ID NO:41) and reverse 5' GTG TGC ATG CCG
 GGC GGC ATA TAG GGC GGG GAT TTA AAT GCA AAC GTC CCG CGA AAC GGC
 GAC GCA CCA (SEQ ID NO:42); and *ori*SV40 forward 3'-CTG TGC ATG CCG GGT
 TAA TTA ACG GGC GGG CCG GGT GGT ATT GGT TGA ACC GAG GGT GGT CAT
 GAC ATC GCG (SEQ ID NO:43) and reverse 5'-ATG TCT CCA CGA TAT CAT TCT
 GGC CTC TGA CCG TGT CCA (SEQ ID NO:44). These primers also consist of *Not*I
 (5') and *Aat*II (3') restriction endonuclease sites to facilitate cloning into the *Not*I and *Sac*I
 sites of pCVD442 when these two fragments are joined via a common *Sac*I site and
 generate internal *Not*I, *Pvu*II, *Spe*I, *Bgl*II, *Sma*I and *Dra*I, in order to facilitate cloning of *DnaB*
 fragments into the *DnaB*2 for stable chromosomal integration without antibiotic resistance
 (FIG. 31). This vector is referred to as pCVD442-*TetB*2 (see FIGS. 32 and 33).

In order to clone the *TetB*-*RRP*-*AB* into the pCVD442-*TetB*2, the *TetB*-*RRP*-*AB*
 plasmid DNA was *Not*I/*Bgl*II digested and the appropriate DNA was purified and a ligation
 reaction containing these two components was performed using T4 ligase. The ligation
 reaction was then transformed to DH11 *pir* and colonies screened for the presence and
 orientation of the *TetB*-*RRP*-*AB*. The *TetB*-*RRP*-*AB* clone was transformed into the stable
 SH101 *pir* (Domenberg and Kaper, 1991, supra) and the plasmid designated pCVD442-
TetB-*RRP*-*AB*. Colonies of SH101 *pir* were screened for *TetB*-*RRP*-*AB* gene by PCR, and a
 SH101 *pir* clone pCVD442-*TetB*-*RRP*-*AB* was chosen for use as a mating donor to
Salmonella strains. SH101 *pir* containing the pCVD442-*TetB*-*RRP*-*AB* was mixed to a
Salmonella strain VS50401 (a spontaneous derivative of the paracycline-resistant strain
 VS52 (Law et al., 1999, supra) with enhanced resistance to Difco MacConkey 285) by
 standard methods (Davis, R. W., DeLencle, D., and Roth, J. R. 1980. *Advanced Bacterial*
Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor) and selected for on
 plates containing 50 µg/mL carbenicillin (carb) and 300 µg/mL streptomycin (strep). The
 resulting VS50401-*pCVD442-TetB*-*RRP*-*AB* clones were checked for pCVD442-*TetB*-*RRP*-
AB gene by PCR.

24.2. TRANSFER OF THE CHROMOSOMALLY INTEGRATED pCVD442-*TetB*-*RRP*-*AB* INTO 41.2.9 (VS1646) TO GENERATE THE STRAIN 41.2.9-*TetB*-*RRP*-*AB*

Using bacteriophage P22 (strain MT05/1 100-201; Davis et al., 1980), 41.2.9 was
 transferred to carbenicillin resistance using strain VS50401-*TetB*-*RRP*-*AB* as donor. The
 presence of the *his* and *lacZ* genes from pCVD442 allowed the selection of a *his*⁺ (or
lacZ⁺) *arr* strain designated 41.2.9-*pCVD442-TetB*-*RRP*-*AB* which contained both the *DnaB*2
 and *DnaB*2-*TetB*-*RRP*-*AB* genes (FIG. 33, 33). Strain 41.2.9-*TetB*-*RRP*-*AB* was placed
 on LB agar to select a *his*⁺ *lacZ*⁺ derivative to remove the *DnaB*2 gene and leave the
*DnaB*2-*TetB*-*RRP*-*AB* gene according to the methods of Domenberg and Kaper, 1991,

- 38 -

(206)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/51349

PCACB0023242

agar (P83, 33, 34) except that the LB-agarose agar plates were made without NaCl, and the plates were incubated at 30°C. After the growth of colonies on these plates, they were gridded to an agar plate and replica plated to either erythromycin- or tetracycline-containing plates in order to detect the presence of a clone which secretes both the oxidase and tetracycline resistance. The resulting clones were checked for the presence of the Tet-BRP-AD gene by PCR. One such derivative containing the strongly integrated Tet-BRP-AD and lacking sucrose sensitivity and erythromycin resistance was detected as 41.2.5-Tet-BRP-oxodase AD.

41.2.5-Tet-BRP-oxodase AD was tested for cytotoxicity in vitro using a standard LDH cytotoxicity assay (CytotoxTM96; Promega, Madison, Wisconsin). The results are shown in FIG. 34, demonstrating the toxic properties of oxodase-expressing clones 26 and 31. Clones 26 and 31 had a significantly higher percentage of cytotoxicity when treated with tetracycline than when not treated with tetracycline.

25. EXAMPLE: EXPRESSION OF HEMOLYSIN BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that tumor-targeted bacteria can be engineered to express hemolytic proteins such as hemolysin constitutively or under inducible control.

Hemolysins are well known cytotoxic proteins which have the ability to lyse red blood cells (see, e.g., Boriss, 1991; Mied, *Biochemical Biophysics* 186:167-182). *Staph*

(Opstank Number BCOT38954) is a phage hemolysin found in most wild type *E. coli* which is not normally expressed (Gerasimov et al., 1998; FEBS Microbiol Lett 168:83-90). *Staph* (p.k.a. *Staph*; Genbank Number U57430) was cloned by PCR using the following primers (forward) 5'-TTTCTTCAT GCTATTATG ACTGAAATCG TTGACAGTAA AACGG-3' (SEQ ID NO.45) and (reverse) 5'-TTTCTTAAGC TTCGCGGCTC AGACATCAGG-3' (SEQ ID NO.46) from wild type *E. coli* strain 2587, Yale University *E. coli* Genetic Stock Center) under standard PCR conditions. The PCR product of the correct size was cloned into the *hml* and *hmlII* sites of pUC93a (Pharmacia) in order to place it under the partially constitutive promoter. The PCR product was also cloned into the *ery*-*gal*-*lacZ* vector (described supra) cut with *NcoI* and *Spe*RV. *E. coli* DH5 α (Life) were then transformed with the plasmids and plated to blood agar (tryptic soy agar with 5% sheep blood, Becton-Dickinson, Lincoln, IL) with and without the addition of 0.2 μ g/ml tetracycline. Positive colonies were picked as those containing colonies of colonies without the colony which indicates hemolysis. Positive colonies were subjected to standard plasmid purification and transfected to *Salmonella* VS01 and re-screened for hemolysis.

Constitutive hemolysis is shown in FIG. 35 (2A and 2B) for the *hml* construct, where α -hml is observed with or without added tetracycline. Tetracycline

(207)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/00000

PCT/JP00/00000

dependent halo formation is shown in FIG. 3A and 3B) for the tetracycline-promoter driven *Shed*, whereas no halo is observed without the addition of tetracycline. These results demonstrate that a tumor-targeted bacterium can express a hemolytic protein, either constitutively or under inducible control.

26. EXAMPLE: EXPRESSION OF METHIONASE BY TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example demonstrates that attenuated tumor-targeted bacteria such as *Salmonella* can be engineered to express methionase.

Methionase is an enzyme that degrades methionine, an essential amino acid necessary for tumor growth. Methods have been described for administration of purified methionase to inhibit tumor growth or to administer a DNA or viral vector which codes for methionase (International Publication No. WO0009589 by Xu and Jia). Xu and Jia did not disclose methods for using tumor-specific bacterial vectors for delivery of methionase, and, in order to achieve efficacy with purified protein, large amounts of methionase are required. A novel method for delivering methionase directly to the tumor is to express the enzyme using tumor-targeted bacteria.

The following primers were generated for methionase from *Pseudomonas putida* based upon Genbank No. U43933.

Forward: METH-SEN1

5'-GCGGCTGGACATCCAGGCTCCAAACAGCTGCA-3' (SEQ ID NO:47); and

Reverse: METH-BAM

5'-GCGCGGATCCCTACCCACTGCGGCTTGAGTGCCTC-3' (SEQ ID NO:48)

Using the above listed primers (4 nM) and an isolated culture of *Pseudomonas putida* as the template, the sequence of methionase was amplified by PCR under the following conditions:

one cycle of 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 1 minute, 68°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes. A final single-extension step of 72°C for 10 minutes was included as the last step of the PCR reaction. PCR products were resolved on 0.8% 1XTAE agarose gel and a PCR product of the expected size for methionase (~ 1196 bp) was identified. The band was excised from the gel and purified using the QIAgen gel extraction kit.

Both the pSP72 vector and the hybrid gel purified methionase gene obtained above were digested with the restriction enzymes *Xba*I and *Bam*HI. The digested vector and methionase were resolved on a 0.8% 1XTAE agarose gel. The products of the digestion

(208)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W0 002827

PC Y06013242

corresponding to the linearized vector and digested nucleotide gene were copied from the gel and purified using the Qiagen gel extraction kit. The linearized vector and the insert (nucleotide) were ligated together using T4 ligase. The ligation mixture was transformed into *Blues Steel* cells by a heat shock method. After recovery, the cells were plated to LB media containing 100 μ g/ml of ampicillin (Amp) to select for those cells that contain the recombinant vector. Ampicillin colonies were identified by the presence of the *amp^r* gene. Vector containing the nucleotide gene were confirmed by plasmid preparation using a Qiagen mini-prep kit and restriction digest with the enzymes *Eco* RI and *Bsp* HI. Clone #9, was sent for sequencing to the Yale sequencing Facility, Yale University School of Medicine. Sequence was done using both the SP6 (forward) and T7 (reverse) sequencing primers. Results demonstrate 100% sequence match to published nucleotide sequence with the exception of the TGA stop codon which was changed to TAA by PCR. Nucleotide activity can be determined using the nucleotide assay described in Hest et al., 1996, *Cancer Research* 56:2116-2122.

37. EXAMPLE: EXPRESSION OF APOPTIN PROTEIN AS A TAT FUSION IN A TITRATED TUMOR-TARGETED BACTERIA

The following example is directed to the use of the recombinant tumor-targeted bacteria can be engineered to express and secrete fusion proteins comprising an effector molecule and a fatty peptide such as TAT, antitumor, VEGF, and Kaposi BGF MTS.

37.1. CONSTRUCTION OF TAT-APOPTIN VECTORS

The c-myc virus (CAV) protein apoplin is known to induce apoptosis in neoplastic cells, as when delivered by adenoviral vectors (see, e.g., Nishimura et al., 1999, *Cancer Therapy* 6:852-892).

In order to generate a protein which could be transcribed in the cytoplasm of *Salmonella* and yet have the ability to be transported to the nucleus of a tumor cell and cause apoptosis, the apoplin protein was fused to a peptide derived from the human immunodeficiency virus (HIV) TAT protein (see, e.g., Schwartz et al., 1998, *Science* 285:1569-1572). Since TAT protein fusions have also been shown to be functional when fused to poly-histidine (boreschindler) amino acids which bind to increase the positive charge and facilitate protein purification (Schwartz et al., 1999, *Science*), the TAT-apoplin fusion was generated with and without the hexahistidine (FIG. 36A and B). Further, the TAT-apoplin fusion can be generated with and without an OmpA-ML signal sequence (FIG. 36A and C).

The apoplin and hexahistidine apoplin are assembled using overlapping oligonucleotides. The nucleic acid sequence encoding apoplin was generated by PCR using the following oligonucleotides:

(209)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 012871 PCT/JP01/0244
 TAP1: 5'-GATCCCATGG CTTATGGCAG AAAAAAACC GTTCAGGACC
 GTCCCATGAA GTCCGTGCAG GAAGATAACC GGGGGGGGG GTCCACGGTG
 TTTCGGGGGG CG-3' (SEQ ID NO:49)

TAP2: 5'-GGGACAGGGT GATGGTGATG CCGCGATGC CGATGGGAT
 TTGGCGGCAA TCCGGGGTTT CCAGCGGCGS CGAGGAGGTC GGGGGGGGAA
 ACGCGTGGA CG-3' (SEQ ID NO:50)

TAP3: 5'-GSCATCGGGS GCATACCAT CACCGTGCC CTGTGGGGT
 GCGGGAACGC GGGGGGGGG ACGTGGGCT CCGCGACGCG GATATACTCC
 GAAAAACATCG CC-3' (SEQ ID NO:51)

TAP4: 5'-GGGATATGG GACGGATCGC AGGAGCGTTT TTTCGAGGCG
 GGGTTGGCT GATGGTGGC CACATCCCGG ACGTTTAA ACCCGTGT
 TTGGAGTTA TCCGCGCTCG C-3' (SEQ ID NO:52)

TAP5: 5'-GCTTCGATCC GTCCGAATAT CCGTGTCCG AACTGAAAG
 ATCCCTGATC ACCAGCAGCC GGTCCGGCC GCGACCGGC GCGCGTGCA
 TCCGCTCTG AAAGCTTCAT G-3' (SEQ ID NO:53)

TAP6: 5'-CATCAAGCTT TCAGAGCGGG ATGCAGCGGC GGTGGGTGG C-3'
 (SEQ ID NO:54)

The nucleic acid sequence encoding the basalstudies-containing region of the TAT-
 apoplin fusion protein was generated using TAP 2-TAP6 oligonucleotides and TAP6H
 oligonucleotide (5'-GATCCCATGG CTTATGGCAG AAAAAAACC GTTCAGGACC
 25 AAAAAACCGG TCAGCGGGT CCGTGAAGS GGTGCAGGA AGATACCGG
 CCGGGGGG-3'; SEQ ID NO:55). The nucleic acid sequence encoding for OmpA^{BL}-
 containing region of the TAT-apoplin fusion protein is generated from the PCR product of
 TAP1-TAP6 oligonucleotides by PCR using TAP6 oligonucleotide and ompA^{BL}
 oligonucleotide (5'-GATCCCATGG CTAATAAGAC GGTCTGCGC CTTCGCTCT
 30 TGCCTTTAGC GGTGACTAGT GTACCGCAGS CCTATGGGG CAAAAACGC
 GGTGAGGGC-3'; SEQ ID NO:56).

Each oligonucleotide is formulated into a stock solution which is 4 μM in
 concentration. Using preheated PCR reaction vessels (Pharmacia, Ready-To-Go Beads), 2 μl
 35 of each oligonucleotide was used. The PCR reaction consisted of one cycle at 95° for 5
 minutes; thirty-five cycles at 95°C for 1 minute, 68 °C for 1 minute, 72°C for 1 minute; and
 one cycle at 72°C for 10 minutes. The PCR reaction was then interrupted with

- 102 -

(210)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 04/28/04

PCT/JP2003/01341

phosphatase, precipitated with ethanol, redissolved in water and subjected to restriction digestion with Nco I and Hind III. The restriction-digested PCR product was resolved by gel electrophoresis and the product of the correct size (approximately 420 and 410 bp for TAT-apoptin and lutealindoxin-TAT-apoptin, respectively) were excised from the gel and isolated using standard molecular biology techniques. These products are ligated into Nco I and Hind III digested pGEMT (Pharmacia) and result in the pGEMT-TAT-apoptin construct. The correct DNA sequences was obtained for both the TAT-apoptin (FIG. 37) and the lutealindoxin-TAT-apoptin (FIG. 38).

27.2. DEMONSTRATION OF SECRETION AND UPTAKE OF TAT-APOPTIN

Attenuated tumor-targeted bacteria are transfected with the pGEMT-TAT-apoptin construct by standard techniques known in the art (e.g., by heat shock or electroporation) and cultured in medium. The supernatant from the bacterial culture is tested for the presence of TAT-apoptin using techniques known to those of skill in the art (e.g., Western blot analysis or ELISA). Once the presence of the TAT-apoptin in the supernatant of the bacterial culture is confirmed, the bacterial culture supernatant is inoculated with mammalian cells (e.g., NIH3T3, CHO, 293, and 780T cells) and the presence of the TAT-apoptin inside the cells is confirmed by apoptosis assays known to those of skill in the art.

27.3. DEMONSTRATION THE UPTAKE OF TAT-APOPTIN INTO TUMORS

Attenuated tumor-targeted bacteria engineered to express TAT-apoptin or apoptin are administered intravenously to a B16 tumor model. The mice are sacrificed several days after administration of the bacteria and the organ weights are determined. Tumors are assayed for the presence and localization of TAT-apoptin or apoptin using appropriate assays (e.g., DNA labeling and Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)) known to those of skill in the art. Further, the size of the tumors are assayed to determine anti-tumor activity of the TAT-apoptin. Tumors are also homogenized and plated to determine the colony forming units (c.f.u.).

28. EXAMPLE: EFFICACY OF THE COMBINATION OF VITONING AND CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON THE GROWTH OF METASTATIC CARCINOMA IN MICE

The following example demonstrates that the administration of attenuated tumor-targeted bacteria in combination with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinomas.

(211)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 00/5879

PCN00000241

25.2. EFFECTS OF THE COMBINATION OF VNP20009
AND CYTOSAR OR VNP20009 AND MITOMYCIN C ON
THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE

Liquid nitrogen stored M27 murine lung carcinoma cells (1×10^6 cells) were recovered by rapidly thawing the cells at 37°C and cultured with $10 \mu\text{l}$ of DMEM culture medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C , 5% CO_2 . After passing the cells for two generations, M27 cells in 96 plates were recovered by trypsinization, washed with 1 x PBS, and reconstituted to 2.5×10^5 cells/ml with 1 x PBS for tumor implantation. An M27 cell suspension was implanted into 100 C57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g; 5×10^5 cells/mouse) subcutaneously in the right flank on Day 0. The mice were randomly divided into two groups with each group consisting of 10 mice.

Salmonella strain VNP20009 was diluted to 5×10^8 CFU/ml with 1 x PBS with the standard dilution procedures. Each mouse was intraperitoneally administered 0.2 ml of diluted *Salmonella* (1×10^8 CFU/mouse) on day 12 according to Table 6, supra. In order to determine the actual number of injected bacteria, day 5×10^8 CFU/ml bacterial suspensions were further diluted to 1×10^5 CFU/ml and plated on nutrient agar (Difco) plates; International Publication No. WO 99/11053). The colonies formed were counted the next day.

The mitomycin C (Sigma) and cytosar (Sigma) were administered to mice according to Table 7, supra. The second dose of mitomycin C was given to the combination groups on day 22 but not those treated with mitomycin C only due to the large size of the tumor. 200 μg of Cipro (Bayer Inc., West Haven, CT) was administered to each mouse treated with VNP20009 alone or VNP20009 + chemotherapeutic drugs since severe toxic reactions were observed in groups treated with VNP20009 + cytosar. The tumor volume was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and mortality of the animals was observed daily. The mice were kept in a clean, temperature controlled laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided with enough food and drinking water.

Table 7

Group	Number of Mice
No treatment control	10
3 mg/kg mitomycin C, i.v., day 15	10
2 mg/kg mitomycin C, i.v., day 15	10
160 mg/kg cytosar, i.p., day 15	10
200 mg/kg cytosar, i.p., day 15	10
VNP20009, 1×10^8 /mouse i.v., day 12	10

(212)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

VNP 20009	PCN 20009
Group	Number of Mice
VNP20009, 1x10 ⁶ mouse i.v., day 12 + 9 mgk mitomycin C, i.v., days 15 & 22	10
VNP20009, 1x10 ⁶ mouse i.v., day 12 + 9 mgk mitomycin C, i.v., days 15 & 22	10
VNP20009, 1x10 ⁶ mouse i.v., day 12 + 280 mgk cytosine, i.v., day 15	10
VNP20009, 1x10 ⁶ mouse i.v., day 12 + 280 mgk cytosine, i.v., day 15	10

As shown in FIG. 39, the combination treatment with VNP20009 + cytosine inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone or cytosine treatment alone. As shown in FIG. 40, the combination of VNP20009 + mitomycin C inhibited the growth of the M27 lung carcinoma more than mitomycin C alone. However, the combination of VNP20009 + mitomycin C did not inhibit the growth of the M27 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone (FIG. 40). These results suggest that the administration of attenuated cancer-targeted bacteria in combination with a chemotherapeutic agent may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

28.2. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VNP20009 AND CISPLATIN ON THE GROWTH OF M27 LUNG CARCINOMA IN MICE

Liquid nitrogen stored M27 murine lung carcinoma cells (1×10^6 /ml \times 1ml) were recovered by rapidly thawing the cells at 37°C and cultured with 25 ml of DMEM culture medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C, 5% CO₂. After passing the cells for two generations, M27 cells in log phase (about 90-95% confluence) were removed by trypsinization, washed with 1 x PBS, and resuspended to 2.5×10^6 cells/ml with 1 x PBS for tumor implantation. An M27 cell suspension (0.2 ml) was implanted into 3G-C57BL/6 mice (female, aged 8 weeks, 20 g; 1×10^6 cells/mouse) subcutaneously at the right flank on day 0.

The mice were randomly divided into groups with each group consisting of 9 mice. Subcutaneous VNP20009 was diluted to 5×10^6 CFU/ml with 1 x PBS with our standard dilution procedures. Each mouse was administered via the tail vein 0.2 ml of *Salmonella* (1×10^6 CFU/mouse) on day 12 according to Table 3, supra. In order to determine the actual number of injected bacteria, the 5×10^6 CFU/ml bacterial suspension was further diluted to 1×10^6 CFU/ml and plated on M27b plates. The colonies formed were counted the next day.

(213)

JP 2004-500042 A 2004.1.18

W00000000

W00000000

The cisplatin was administered to mice on day 14, ten days post bacterial injection (Table 2, Fig. 2). The cisplatin was diluted to 0.5 mg/ml with normal saline prior to administration. The tumor volume was measured twice a week until the end of the experiment. The behavior, appearance and mortality of the animals was observed daily. The mice were kept in a clean, temperature constant laboratory. The bedding was changed twice a week and the mice were provided with enough food and drinking water.

Table 2

Group	Number of Mice
Control (no treatment)	9
VNP20009, 1×10^6 bacteria i.v., on day 12	9
3 mg/kg cisplatin, i.p., q.w x 2, on day 14, 15	9
VNP20009, 1×10^6 bacteria i.v., on day 12 + 3 mg/kg cisplatin, i.p., q.w x 2, on day 14, 15, 16	9

As shown in FIG. 3, the combination treatment with VNP20009 + cisplatin inhibited the growth of the A127 lung carcinoma more than VNP20009 treatment alone or cisplatin treatment alone. These results suggest that the administration of neoplastic tumor-attached bacteria in combination with chemotherapeutic agents such as cisplatin may act synergistically or additively to inhibit the growth of solid tumors such as lung carcinoma.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entirety.

30

35

- 105 -

PT 74(TS)011412

WHAT IS CLAIMED IS:

- 167 -

(215)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO/03/08291

PCT/JP03/023242

8. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 7, wherein the bacteriocin family members are ColE1, ColE1a, ColE1b, ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, Colicin A, Colicin K, Colicin L, Colicin M, colicin D13, peptide A1122, staphylococin 155B, burynacin 7423, pyocin R1 or A241, magacin A-216, vitulocin, or microcin B15.
9. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is a tumor-inhibitory enzyme.
10. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 9, wherein the tumor-inhibitory enzyme is methionase, asparaginase, lipase, phospholipase, protease, DNase or glycosidase.
11. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is histolytin, resorcinol, CNP1, CNP2, or PMT.
12. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.
13. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 2, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-angiogenesis, a pro-drug-converting enzyme, an enzyme molecule, a ribozyme, or an antigen.
14. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1 or 2, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.
15. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 1, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.
16. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 2, wherein the secondary effector molecule is a chemokine release factor (CRF).
17. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
18. An attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters,

(216)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 01/25/01

JP 2004012212

wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative aerobe, and said fusion protein comprises a fusing peptide and an effector molecule.

19. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 18, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.

20. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17 or 19, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

21. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 18 or 19, wherein the fusing peptide is derived from the HIV-TAT protein, the attenuated bacteria contain (penicillin), Kanamycin, gentamicin, tetracycline (TET), neomycin-resistance sequence (NRS), herpes simplex virus VP22, immunoglobulin, lectinase, or neuraminidase.

22. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

23. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 17, 18 or 19, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.

24. The attenuated tumor-targeted bacteria of claim 23, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

25. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative aerobe.

26. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effector molecules and one or more secondary effector molecules operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative anaerobe or facultative aerobe.

27. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein at least one of the primary effector molecules is a TNF family member.

09/07/2013 13:26:33

5

1

1

2

?

3

- 110 -

(218)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/00000

PC 01/00000

36. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.
37. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the secondary effector molecule is an immune modulating agent, an anti-tumor protein, a pro-drug converting enzyme, an activator molecule, a cytogenetic, or an antigen.
38. The pharmaceutical composition of claim 25 or 26, wherein the associated tumor-targeted bacteria is *Salmonella*.
39. The pharmaceutical composition of claim 25, wherein the associated tumor-targeted bacteria further comprises an enhanced release system.
40. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the secondary effector molecule is a bacteriocin release factor.
41. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an associated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said promoter directs expression of the fusion protein in the bacteria, wherein said fusion protein comprises a signal sequence and an effector molecule.
42. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an associated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said promoter directs expression of the fusion protein in the bacteria, wherein said fusion protein comprises a fatty peptide and an effector molecule.
43. The pharmaceutical composition of claim 42, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.
44. The pharmaceutical composition of claim 41 or 43, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.
45. The pharmaceutical composition of claim 42 or 43, wherein the fatty peptide is derived from the HIV TAT protein, the antitoxin bacteriocin (antitoxin), Kaposi's sarcoma growth factor (KGF) microRNA-translating sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, hexokinase, hexokinase, or hexokinase.

- 111 -

(225)

1P 2064-500042 A 2004.1.8

5/10 01.15.14

PRYAT50131347

[illegible]

54. The question of claim 18 or 19, wherein at least one of the primary antibodies is a monoclonal antibody that reacts with the antigen and the reaction is not BIP.

52. The method of items 50, wherein the bacteriostatic family member is ColE1, ColE2a, ColE1b ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8, ColE9, ColE10, ColE11, ColE12, ColE13, ColE14, ColE15, ColE16, ColE17, ColE18, ColE19, ColE20, ColE21, ColE22, ColE23, ColE24, ColE25, ColE26, ColE27, ColE28, ColE29, ColE30, ColE31, ColE32, ColE33, ColE34, ColE35, ColE36, ColE37, ColE38, ColE39, ColE40, ColE41, ColE42, ColE43, ColE44, ColE45, ColE46, ColE47, ColE48, ColE49, ColE50, ColE51, ColE52, ColE53, ColE54, ColE55, ColE56, ColE57, ColE58, ColE59, ColE60, ColE61, ColE62, ColE63, ColE64, ColE65, ColE66, ColE67, ColE68, ColE69, ColE70, ColE71, ColE72, ColE73, ColE74, ColE75, ColE76, ColE77, ColE78, ColE79, ColE80, ColE81, ColE82, ColE83, ColE84, ColE85, ColE86, ColE87, ColE88, ColE89, ColE90, ColE91, ColE92, ColE93, ColE94, ColE95, ColE96, ColE97, ColE98, ColE99, ColE100, ColE101, ColE102, ColE103, ColE104, ColE105, ColE106, ColE107, ColE108, ColE109, ColE110, ColE111, ColE112, ColE113, ColE114, ColE115, ColE116, ColE117, ColE118, ColE119, ColE120, ColE121, ColE122, ColE123, ColE124, ColE125, ColE126, ColE127, ColE128, ColE129, ColE130, ColE131, ColE132, ColE133, ColE134, ColE135, ColE136, ColE137, ColE138, ColE139, ColE140, ColE141, ColE142, ColE143, ColE144, ColE145, ColE146, ColE147, ColE148, ColE149, ColE150, ColE151, ColE152, ColE153, ColE154, ColE155, ColE156, ColE157, ColE158, ColE159, ColE160, ColE161, ColE162, ColE163, ColE164, ColE165, ColE166, ColE167, ColE168, ColE169, ColE170, ColE171, ColE172, ColE173, ColE174, ColE175, ColE176, ColE177, ColE178, ColE179, ColE180, ColE181, ColE182, ColE183, ColE184, ColE185, ColE186, ColE187, ColE188, ColE189, ColE190, ColE191, ColE192, ColE193, ColE194, ColE195, ColE196, ColE197, ColE198, ColE199, ColE200, ColE201, ColE202, ColE203, ColE204, ColE205, ColE206, ColE207, ColE208, ColE209, ColE210, ColE211, ColE212, ColE213, ColE214, ColE215, ColE216, ColE217, ColE218, ColE219, ColE220, ColE221, ColE222, ColE223, ColE224, ColE225, ColE226, ColE227, ColE228, ColE229, ColE230, ColE231, ColE232, ColE233, ColE234, ColE235, ColE236, ColE237, ColE238, ColE239, ColE240, ColE241, ColE242, ColE243, ColE244, ColE245, ColE246, ColE247, ColE248, ColE249, ColE250, ColE251, ColE252, ColE253, ColE254, ColE255, ColE256, ColE257, ColE258, ColE259, ColE260, ColE261, ColE262, ColE263, ColE264, ColE265, ColE266, ColE267, ColE268, ColE269, ColE270, ColE271, ColE272, ColE273, ColE274, ColE275, ColE276, ColE277, ColE278, ColE279, ColE280, ColE281, ColE282, ColE283, ColE284, ColE285, ColE286, ColE287, ColE288, ColE289, ColE290, ColE291, ColE292, ColE293, ColE294, ColE295, ColE296, ColE297, ColE298, ColE299, ColE300, ColE301, ColE302, ColE303, ColE304, ColE305, ColE306, ColE307, ColE308, ColE309, ColE310, ColE311, ColE312, ColE313, ColE314, ColE315, ColE316, ColE317, ColE318, ColE319, ColE320, ColE321, ColE322, ColE323, ColE324, ColE325, ColE326, ColE327, ColE328, ColE329, ColE330, ColE331, ColE332, ColE333, ColE334, ColE335, ColE336, ColE337, ColE338, ColE339, ColE340, ColE341, ColE342, ColE343, ColE344, ColE345, ColE346, ColE347, ColE348, ColE349, ColE350, ColE351, ColE352, ColE353, ColE354, ColE355, ColE356, ColE357, ColE358, ColE359, ColE360, ColE361, ColE362, ColE363, ColE364, ColE365, ColE366, ColE367, ColE368, ColE369, ColE370, ColE371, ColE372, ColE373, ColE374, ColE375, ColE376, ColE377, ColE378, ColE379, ColE380, ColE381, ColE382, ColE383, ColE384, ColE385, ColE386, ColE387, ColE388, ColE389, ColE390, ColE391, ColE392, ColE393, ColE394, ColE395, ColE396, ColE397, ColE398, ColE399, ColE400, ColE401, ColE402, ColE403, ColE404, ColE405, ColE406, ColE407, ColE408, ColE409, ColE410, ColE411, ColE412, ColE413, ColE414, ColE415, ColE416, ColE417, ColE418, ColE419, ColE420, ColE421, ColE422, ColE423, ColE424, ColE425, ColE426, ColE427, ColE428, ColE429, ColE430, ColE431, ColE432, ColE433, ColE434, ColE435, ColE436, ColE437, ColE438, ColE439, ColE440, ColE441, ColE442, ColE443, ColE444, ColE445, ColE446, ColE447, ColE448, ColE449, ColE450, ColE451, ColE452, ColE453, ColE454, ColE455, ColE456, ColE457, ColE458, ColE459, ColE460, ColE461, ColE462, ColE463, ColE464, ColE465, ColE466, ColE467, ColE468, ColE469, ColE470, ColE471, ColE472, ColE473, ColE474, ColE475, ColE476, ColE477, ColE478, ColE479, ColE480, ColE481, ColE482, ColE483, ColE484, ColE485, ColE486, ColE487, ColE488, ColE489, ColE490, ColE491, ColE492, ColE493, ColE494, ColE495, ColE496, ColE497, ColE498, ColE499, ColE500, ColE501, ColE502, ColE503, ColE504, ColE505, ColE506, ColE507, ColE508, ColE509, ColE510, ColE511, ColE512, ColE513, ColE514, ColE515, ColE516, ColE517, ColE518, ColE519, ColE520, ColE521, ColE522, ColE523, ColE524, ColE525, ColE526, ColE527, ColE528, ColE529, ColE530, ColE531, ColE532, ColE533, ColE534, ColE535, ColE536, ColE537, ColE538, ColE539, ColE540, ColE541, ColE542, ColE543, ColE544, ColE545, ColE546, ColE547, ColE548, ColE549, ColE550, ColE551, ColE552, ColE553, ColE554, ColE555, ColE556, ColE557, ColE558, ColE559, ColE560, ColE561, ColE562, ColE563, ColE564, ColE565, ColE566, ColE567, ColE568, ColE569, ColE570, ColE571, ColE572, ColE573, ColE574, ColE575, ColE576, ColE577, ColE578, ColE579, ColE580, ColE581, ColE582, ColE583, ColE584, ColE585, ColE586, ColE587, ColE588, ColE589, ColE590, ColE591, ColE592, ColE593, ColE594, ColE595, ColE596, ColE597, ColE598, ColE599, ColE600, ColE601, ColE602, ColE603, ColE604, ColE605, ColE606, ColE607, ColE608, ColE609, ColE610, ColE611, ColE612, ColE613, ColE614, ColE615, ColE616, ColE617, ColE618, ColE619, ColE620, ColE621, ColE622, ColE623, ColE624, ColE625, ColE626, ColE627, ColE628, ColE629, ColE630, ColE631, ColE632, ColE633, ColE634, ColE635, ColE636, ColE637, ColE638, ColE639, ColE640, ColE641, ColE642, ColE643, ColE644, ColE645, ColE646, ColE647, ColE648, ColE649, ColE650, ColE651, ColE652, ColE653, ColE654, ColE655, ColE656, ColE657, ColE658, ColE659, ColE660, ColE661, ColE662, ColE663, ColE664, ColE665, ColE666, ColE667, ColE668, ColE669, ColE670, ColE671, ColE672, ColE673, ColE674, ColE675, ColE676, ColE677, ColE678, ColE679, ColE680, ColE681, ColE682, ColE683, ColE684, ColE685, ColE686, ColE687, ColE688, ColE689, ColE690, ColE691, ColE692, ColE693, ColE694, ColE695, ColE6

36 The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary effector molecules is a tumor inhibitory enzyme.

57. The methods of claim 56, wherein the target inhibitory enzyme is aspartate decarboxylase, lysine methyltransferase, xanthine dehydrogenase, DNAase or glyoxalase.

58. The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the primary coloring dyes is hemocyanin, verdaxin, CNF1, CNF2 or PBT.

59. The product of class 48 or 49, wherein at least one of the primary effecting ingredients are derived from an animal, plant, bacteria, or virus.

60 The subject of claim 49, wherein at least one of the secondary effect molecules is an anti-sense probe, a pro-drug converting enzyme, an antisense molecule, a ribozyme, or an enzyme.

50 61. The number of votes 48 or 49, which is the number of the 48th and 49th votes.

67. The number of children in 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 87

63. The method of claim 49, wherein the secondary effector protein is a transcription release factor.

- 133 -

(221)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/25187

PCN038013142

64. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion proteins comprise a signal sequence and an effector molecule.

65. A method for delivering one or more fusion proteins for the treatment of a solid tumor cancer to a subject in need of such treatment, comprising administering a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated tumor-targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion proteins comprise a fatty peptide and an effector molecule.

66. The method of claim 65, wherein the fusion protein further comprises a signal sequence.

67. The method of claim 64 or 66, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

68. The method of claim 65 or 66, wherein the fatty peptide is derived from the HIV TAT protein, the enteropain bovine domain (porexin), Kaposi fibroblast growth factor (KGF) membrane-translocating sequence (MTLS), herpes simplex virus VP22, luciferin, luciferase, or tetracycline.

69. The method of claim 64, 65 or 66, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

70. The method of claim 64, 65 or 66, wherein the attenuated tumor-targeted bacteria further comprises one or more nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules operably linked to one or more promoters.

71. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an attenuated tumor-targeted bacteria comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more primary effectors.

- 114 -

PRIVATE/CONFIDENTIAL

5

31

12

2

?

3

• 115 •

(223)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

**Colecia K., Colima L., Colina M., clancis D713, puricia A1122, szyltylococis i500,
murecic 1423, murecic R1 or G4d1, murecic A-216 viliaciz or mikrocic M15**

79. The answer to Q. 71 or 72, whichever at least one of the primary witnesses made, is a proper inference from the evidence.

89. The method of claim 79, wherein the tumor-inhibitory enzyme is methionase, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, or glutamate decarboxylase.

84. The method of claim 71 or 72, wherein at least one of the primary effector molecules is hemithymine, vesetidine, CNF1, CNF2, or PMT.

112. The method of claim 71 or 72, wherein the primary effector molecule is derived from an animal, plant, bacteria, or virus.

83. The method of claim 82, wherein the secondary effector molecule is an immunomodulating agent, an anti-tumor protein, an oncogene-inactivating enzyme, a nucleic acid molecule, a ribozyme, or an enzyme.

84. The subject of claim 71 or 72, wherein the attenuated virus-targeted bacterin is *Salmonella*.

83. The method of claim 73, wherein the aqueous solution comprises a surfactant and the surfactant is an anionic surfactant.

25 26. The product of chain 72, wherein the secondary effector molecule is a
transcription factor.

87. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more bacteriophage agents and a plasmid vector only nonreplicably carried and an attenuated mycoplasma-labeled bacteria comprising one or more surface and membrane proteins, capturing one or more surface proteins operably linked to one or more promoters, wherein said attenuated mycoplasma-labeled bacteria is a thermotrophic serovar or subspecies serovar and said plasmid vector contains a viral promoter and the serovar or subspecies serovar.

35 86. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a preincubated non-inactivated bacterin

(224)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

500-000000

PC0000000000

comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more fusion proteins operably linked to one or more promoters, wherein said nucleic acid molecules are targeted bacteria is a facultative aerobe or facultative anaerobe and said fusion protein comprises a fatty peptide and an effector molecule.

5 89. The method of claim 88, wherein said fusion protein further comprises a signal sequence.

90. The method of claim 87 or 89, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

10 91. The method of claim 88 or 89, wherein the fatty peptide is derived from the HIV TAT protein, the secretin-like bacteriocin (penetrin), Kaposi fibroblast growth factor (KGF) membrane-transferring sequence (MTS), herpes simplex virus VP22, bovine lactoferrin, bovine lactalbumin, or bovine albumin.

15 92. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

93. The method of claim 87, 88 or 89, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule and said nucleic acid molecules encoding one or more effector molecules are operably linked to one or more promoters.

20 94. A method of treating a solid tumor cancer in an animal, comprising administering one or more chemotherapeutic agents and a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and an anti-tumor targeted bacteria.

95. A fusion protein comprising an OmpA-like protein and an effector molecule.

30 96. A fusion protein comprising a signal sequence, a fatty peptide and an effector molecule.

97. The fusion protein of claim 96, wherein the signal sequence is an OmpA-like protein.

55 98. The fusion protein of claim 96, wherein the fatty peptide is derived from the HIV TAT protein, the secretin-like bacteriocin (penetrin), Kaposi fibroblast growth factor (KGF) membrane-transferring sequence (MTS), herpes simplex virus VP22,

• 117 •

(225)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

FIG. 1A

FIG. 1B

, heparin sulfate, heparin, or heparan sulfate.

99. The fusion protein of claim 95 or 96, wherein the effector molecule is a primary or secondary effector molecule.

5

10

15

20

25

30

35

- 118 -

(226)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WDGUSM

PCX0800004

1/42

ATG GTA GGT AGC TGC TGT CEC ACT CCG TCG GAT AAG CCG GTT GCT
 H V R S S S R T P S D K P Y A
 CAT GTA GTT GCT AAC CTT CAG GCA GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTR
 H Y V A N P Q A E G Q L Q N L
 AAC GGT GRC GGT AAC GGC CTG CTG GCA AAC GGC GTT GAG CTC GGT
 H R R A N A L L A N S V E L R
 GAT AAC GAG CTC GTG GTA CTT TCT GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT
 D N Q L V Y P S G G L Y L I Y
 TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG GGC TGC CCG TCG ACT CAT GTT
 S Q Y L F K G Q G C P S T R V
 CTG CTG ACT CAC AGC ATC AGC GGT ATT GCT GTA TCT TAC CAG ACC
 L L T N Y Y S R I A V S Y Q T
 AAA GTT AAC CTG CTG AGC GGT ATC AAG TCT CCG TCG CAG GGT GAA
 K V R L L S A I K S P C Q R E
 ACT CCG GAG GGT GCA GAA GCG AAA CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC
 Y P E S A E A K P W Y E P I Y
 CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG AAA GGT GAC GGT CTG TCG GCA
 L S G V F Q L E K G D R L S A
 GAA ATC AAC GGT CTT GAC TAT CTA GAT TTC GGT GAA TCT GGC CAG
 E I N R P D Y L D F A E S G Q
 GTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG TAA
 K Y F G I I A L *

FIG.1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(227)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W01013789

PCY0500000000

2/42

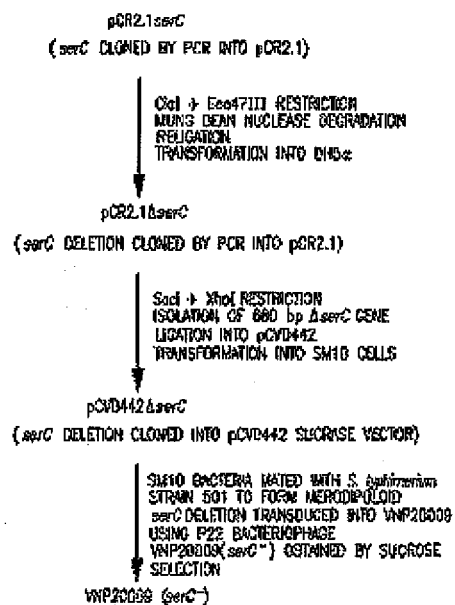
DERIVATION OF THE VNP20009(*serC*⁻) STRAIN.

FIG.2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(228)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO01/02387

(C) 2001/02/24

3/42

Quantitation of TNF α expression by pTS-BrpTNF α Clone 2.

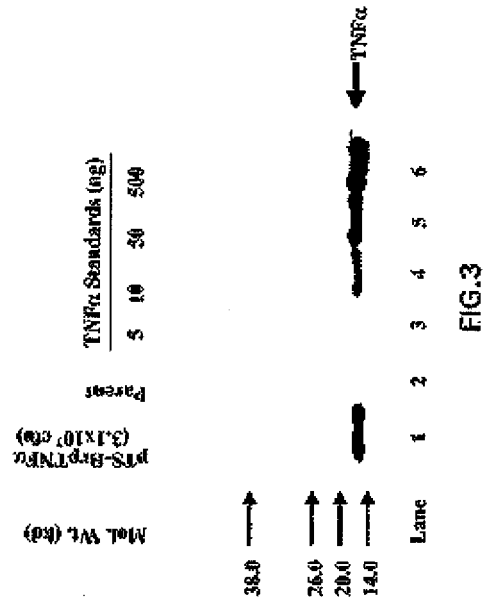


FIG.3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(229)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 00/0000

PC0000000000

4/42

ATG AAA AAG ACA GGT ATC CCG ATT GCA GAG GCA CTG GCT GGT TTC
 N K K T A I A I A V A L A G F
 GCT ACC GTA GGG CAG GGC CAT ATG GTA GGT AGC TGC TCT GCG ACT
 A T V A Q A H H V R S S S R I
 CGA TCC GAT AAG CCG GTT GCT CAT GTA GTT GCT AAC GCT CAG GCG
 P S D K P V A H V Y A N P Q A
 GAA GGT CAG CTG CAG TGG CTG AAG GAT GCG GCT AAG GCG CTG CTG
 E G Q L Q M L N R R A N A L L
 GCA AAG GGC GGT GAG CTC GGT GAT AAG CAG CTC GAG GTA CCT TCT
 A H G Y E L R D N Q L V V P S
 GAA GGT CTG TAC CTG ATC TAT TCT CAA GTA CTG TTC AAG GGT CAG
 E G L T L I Y S Q Y L F K G Q
 GGC TGC CCG TGG ACT GAT GTT CTG CTG ACT CAG ACC ATC AGC GGT
 G C P S T H V L L T H T I S R
 ATT GGT GTA TCT TAC CAG ACC AAA GGT AAG CTG CTG AGC GCT ATC
 I A V S Y Q T R Y H L L S A I
 AAG TCT CCG TGC CAG GGT GAA ACT CCG GAG GGT GCA GAA GCG AAA
 K S P C Q R E T P E G A E A K
 CCA TGG TAT GAA CCG ATC TAC CTG GGT GGC GTA TTT CAA CTG GAG
 P M Y E P I T L G G Y F Q L E
 AAA GGT TAC GGT CTG TCC GCA GAA ATC AAG GGT CCT GAC TAT CTA
 K Q D R L S A E I N R P O S L
 GAT TTC GGT GAA TCT GGC CAG CTG TAC TTC GGT ATT ATC GCA CTG
 D F A E S G Q Y Y F G I J A L
 TAA
 #

FIG.4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

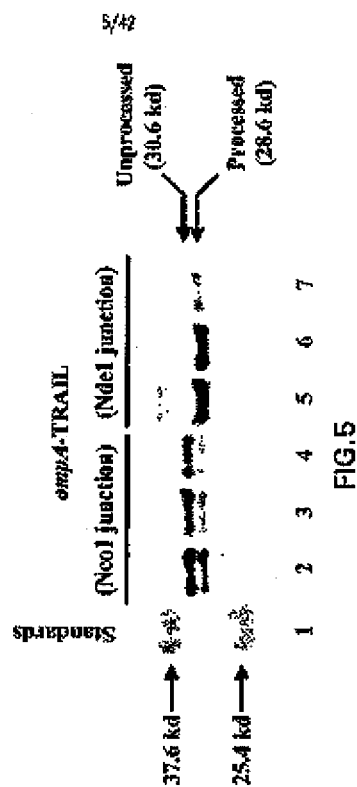
(239)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

S/D 01/01/02

PC 01/01/02

Expression and processing of a *trc* promoter-driven *ompA*-TRAIL fusion gene product in JM109 bacteria.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(231)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD NUMBER

PCYCDRAWING

6/42

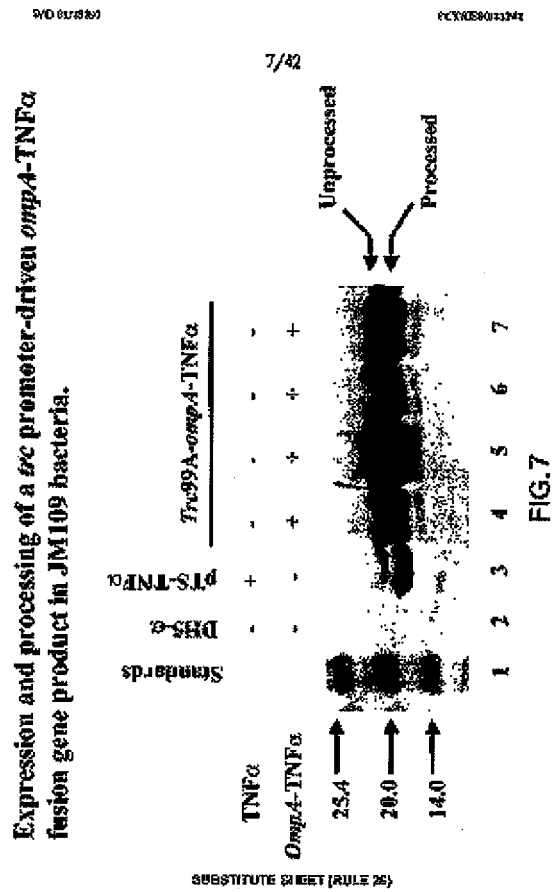
ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GGA GTG GCA CTG GGT TTC
 H K K T A I A I A Y A L A G F
 GCT AOC GTA GCG CAG GCG CAT ATG GCT AAG GAG CTG AAG CAG ATG
 A T Y A Q A H H A W E L K Q H
 CAG GAC AAG TAC TTC AAA AGT GCG ATT GCT TGT TTC TTA AAA GAA
 Q D K Y S K S G I A C F L K E
 GAT GAC AGT TAT TGG GAC CCC AAT GAC GAA GAG AGT ATE AAG AGC
 D D S Y W B P H B E E S N W S
 GCG TGC TGG CAA GTC AAG TGG CAA CTC CGT CAG CTC GTT AGA AAG
 P C W Q V K W Q L R Q L F R K
 ATG ATT ITG AGA ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA
 H I L R T S E E T I S Y Y Q E
 AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC GTA GCG AGA GAA AAG GGT GCT CAG
 K Q Q N I S P L V R E R Q P Q
 ABA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GAG ACC ABA GCA ABA AGC AAG ACA
 R Y A A H I T G T R G R S K T
 ITG TCT TCT CCA AAG TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGT GGC AAA
 L S S P N S K H E K A L G R R
 ATA AAG TCC TGG GCA TCA TCA ABA AGT GGG CAT TCA TTC CTG AGC
 I H S W E S S R S G H S F L S
 AAC ITG CAC TTG AAG AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA AAA GAG
 H L H L R H G E L V I H E K G
 TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG GAA
 F Y Y I Y S Q Y Y F R P Q E E
 ATA AAA CAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT
 I K E H T K N D K Q H Y Q Y J
 TAC AAA TAC ACA AGT TAT GGT GAC GCT ATA TTG TTG AAG AAA AGT
 Y K Y Y S Y P D P I L L H K S
 GCT AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT
 A R N S C N S K B A E Y G L Y
 TGC ATC TAT CAA GAG GCA AYA TTT GAG GTT AAG GAA AAT GAC ABA
 S J Y Q G G J F E L K E N D R
 ATT TTT GTT TCT GTA ACA AAT GAG CAC TTG AEA GAC ATG GAC CAT
 I F Y S V T N E H L T D N U H
 GAA GCG AGT TTT TTC GCG GCG TTT TTA GTT GGC TAA
 E A S F F G A F L Y G

FIG.6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(232)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(233)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W00000000

P000000000

8/42

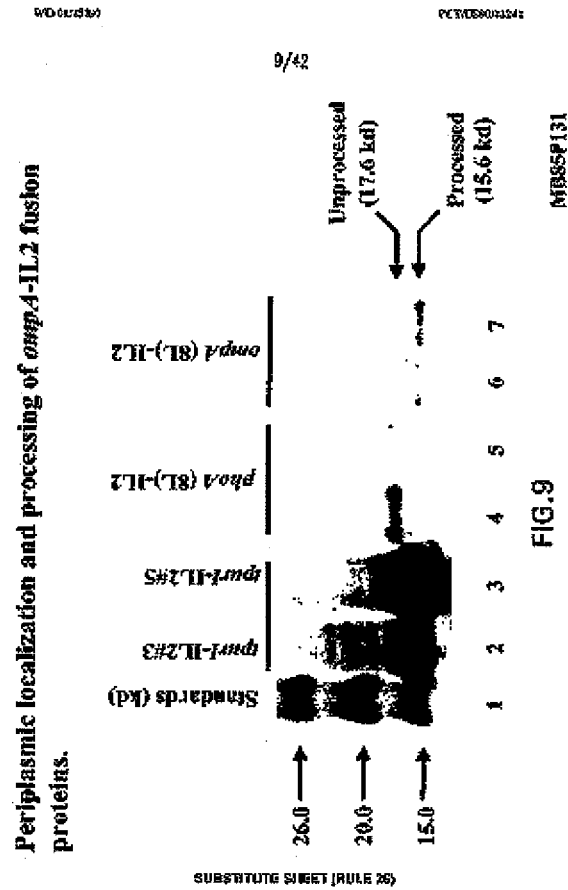
ATG AAA AAG ACG GCT CTG AGC CTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
 N K K T A L A L L L L L L A L
 ACT AGT GTA GCG CAG GCG TGT CCT ACT AGC TGG AGC ACT AAG AAA
 T S V A Q A A P T S S S T K K
 ACT CAA CTG CAA TGG GAG GAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG AAT
 T Q L Q L E H L L L D L Q H F
 CTG AAT GGC ATC AAT AAG TAC AAG AAC GCT AAG CTG ACT GCG ATG
 L H B E N H Y K H P K L T R H
 CTG ACT TTC AAA TTC TAC ATG CTG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
 L T F K F F Y H P K K A T E L K
 CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAC GCG CTG GAG GAA GTA
 H L Q C L E E E L K P L E E Y
 CTT AAG CTG GCA CAG TCT AAG AAG TTC CAC CTG GGT GCG GGT GAC
 L M L A Q S K N F H L R P R D
 CTG ATC TGC AAC ATC AAT GTA ATC GAT CTT GAG CTG AAG GCA TCC
 L I S H I H V I V L E L K G S
 GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TGC GGT GAC GAA ACC GCG ACC ATT
 E Y T F H C E Y A D E T A T I
 CTG GAG TTC CTG AAC GGT TGG ATC ACC TTT GCG GAA TGG ATC ATT
 Y E F L N R H I T F A Q S I I
 ACC ACC TTA ACT TAA
 S T L T *

FIG.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(234)

JP 2004-506042 A 2004.1.8



(235)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/5829

PCT/JP00/03242

10/42

ATG AAA CAG TGG ACT CTG GCG GTT CTG CTC TTG CTG TTA GCG CTG
 H K Q S T L A L L L L L L L A L
 ACT AGT GTG GCG AAA GCG GCT CCT ACT AGC TCG AGC ACT AAG AAA
 T S V A K A A F T S S S T K K
 ACT CAG CTG CAA TTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT CTG CAG ATG ATT
 T Q L Q L E H L L L D L Q N I
 CTG AAT GCG ATC AAT AAC TAC AAG AAC CCT AAG CTG ACT GCG ATG
 L H G I N N Y K H P K L T R H
 CTG ACT TTG AAA TTC TAC ATG GCG AAA AAG GCT ACC GAG CTC AAA
 L Y F K F Y H P K K A T E L K
 CAT CTC CAG TGC CTG GAA GAG GAA CTG AAG GCG CTG GAG GAA GTA
 H L Q C L E E E L K P L G C Y
 CTT AAC CTG GCA CAG TCT AAG AAC TTC GAC CTG GGT GCG GGT GAC
 L M L A Q S K N F H L R P R D
 CTG AAG TGC AAC ATC AAT GTA ATC GTT CTT GAG CTG AAG GAA TCG
 L I S N E N Y I Y L E L K G S
 GAA ACC ACC TTC ATG TGC GAA TAC GGT GAC GAA AAG GCG ACC ATT
 E T Y Y H C E Y A B E T A T T
 GAG GAG TTC CTG AAC GAT TGG ATC ACC TTT GCG CAA TGG ATC ATT
 V E F L N R M I T F A Q S I I
 ABC ADG ITA ACT TAA
 S F L T A

FIG.10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(236)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 11

11/42

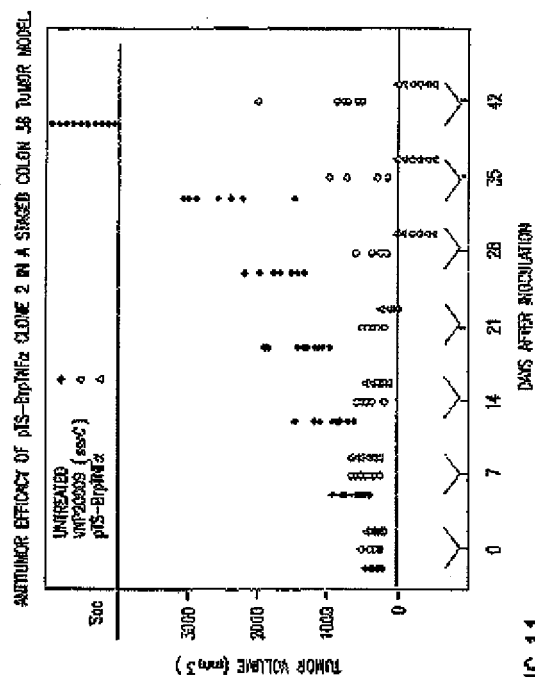


FIG. 11

(237)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/04/05/07

PCY0080112/1

12/42

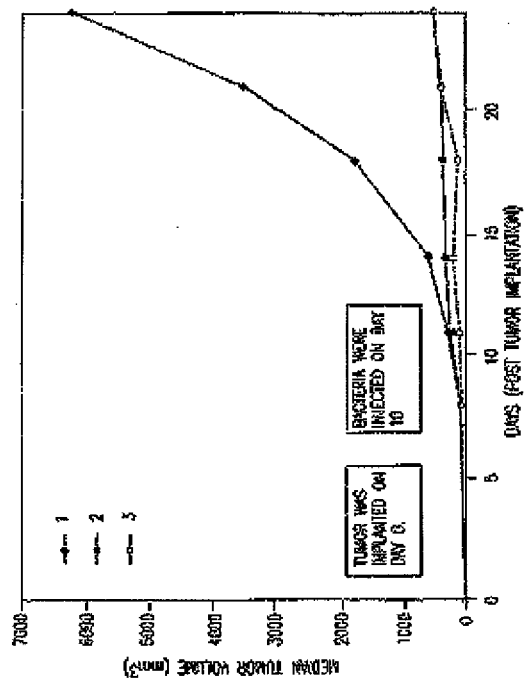


FIG. 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(238)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W0001557

PCX03001241

13/42

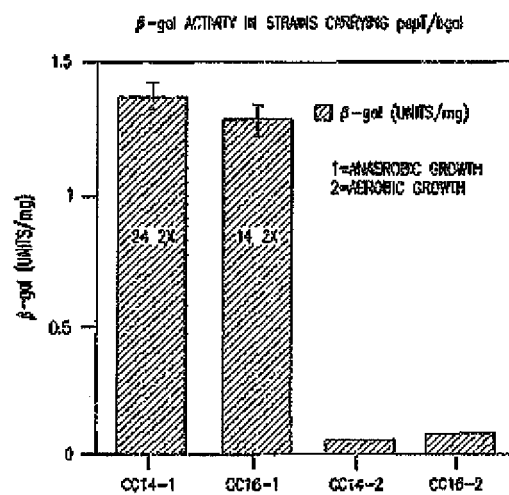


FIG.13A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(239)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/08897

PCT/JP00/02194

14/42

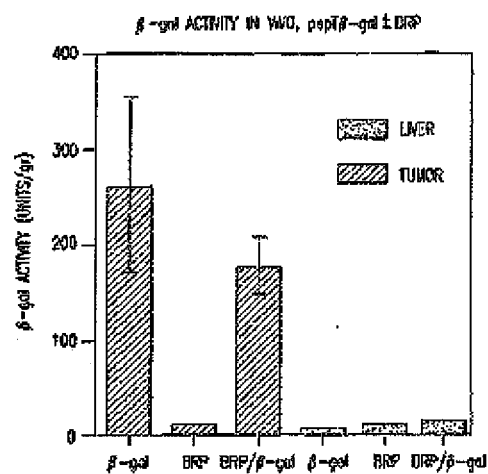


FIG.13B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(240)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W/D 00/5/2004

P/CY 00/5/2004

15/42

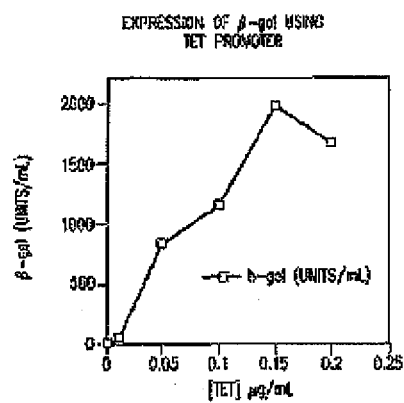


FIG.14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(241)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W001/5107

PCX03001201

16/42

~25 kD →
HexaHIS-codostatin

← → ← → ← →

+ - + - + -

FIG. 15A

~25 kD →
HexaHIS-codostatin

← → ← → ← →

+ + + - + - + - + -

FIG. 15B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(242)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

4/00/589

PCYOSK01201

17/42

25 kD →
HexaHIS-endostatin


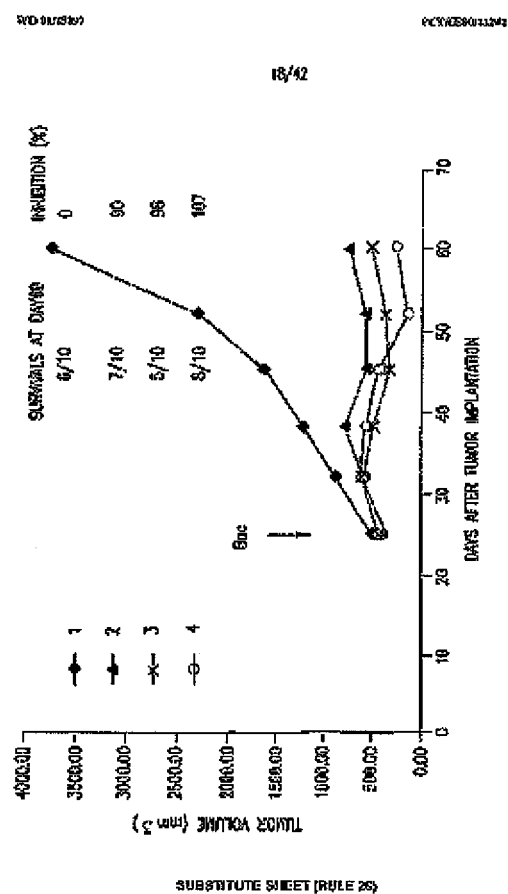


FIG.16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

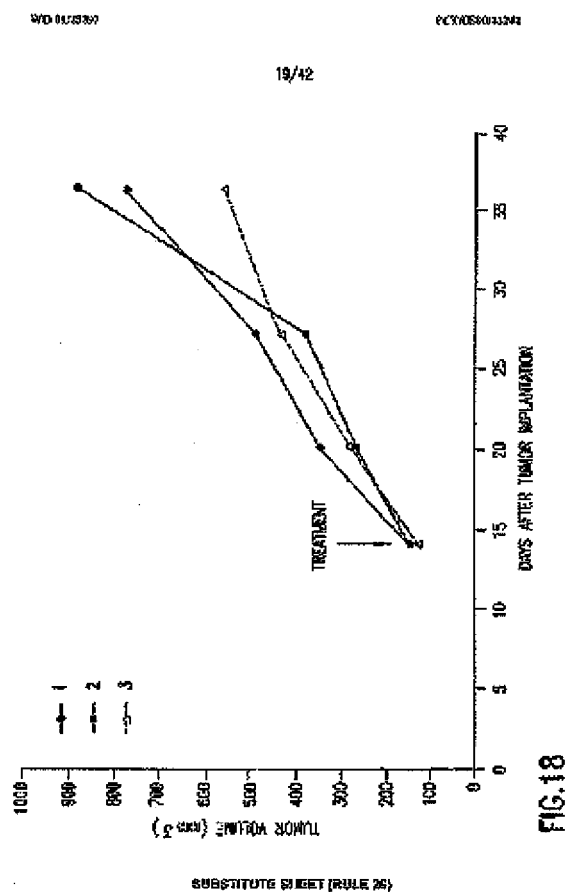
(243)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(244)

JP 2004-509042 A 2004.1.8



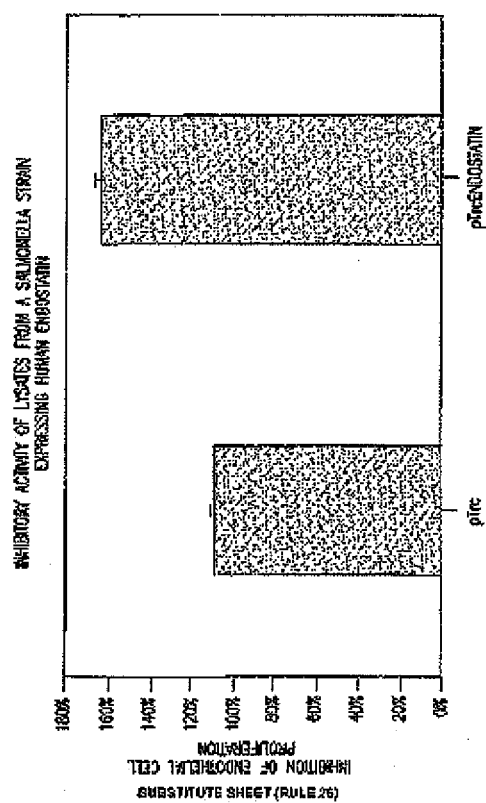
(245)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/25342

PC/US01/25342

20/42



(246)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/O 01/23/07

PC/0000012307

21/42

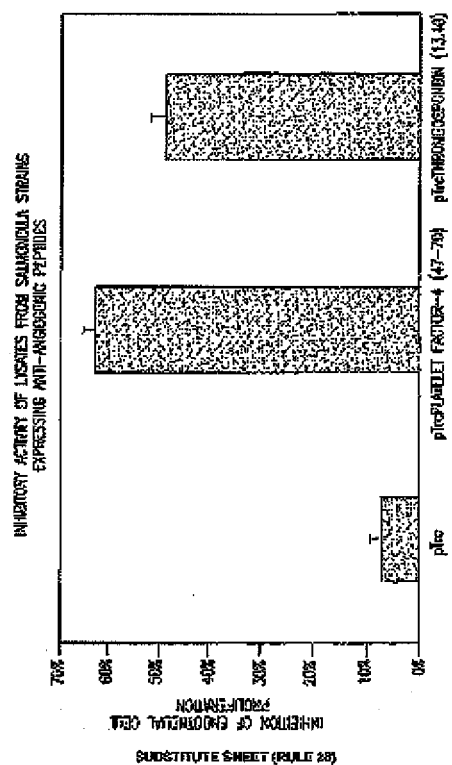


FIG.20

(247)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/0/05/23/27

0/0/05/23/27

22/42

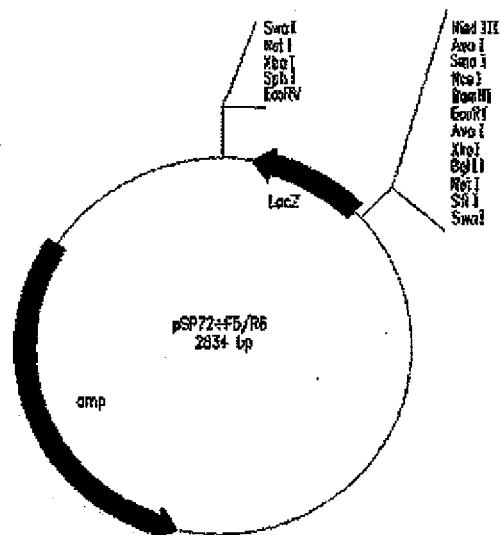


FIG.21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(248)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 01/03/01

PCY0800000000

23/42

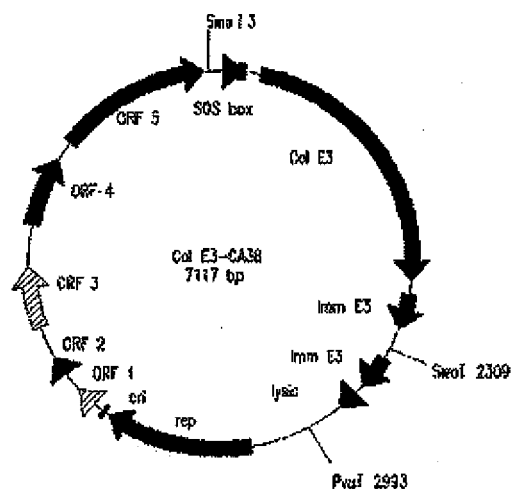


FIG.22

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(249)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/D 01/09/97

PCT/US98/022242

24/42

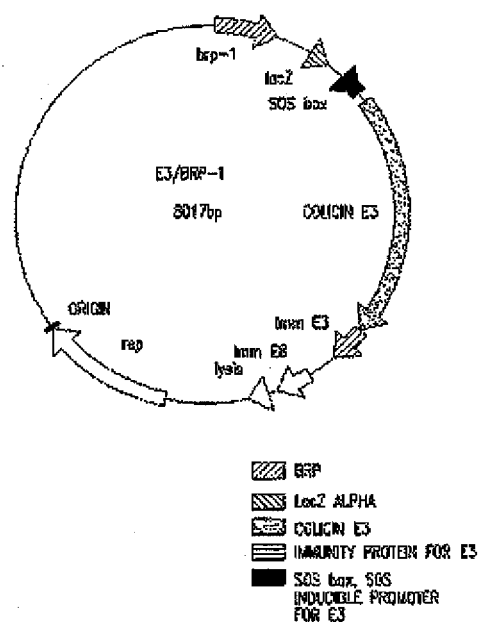


FIG.23

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(250)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W/D 01/28/99

PCX/068013242

21/42

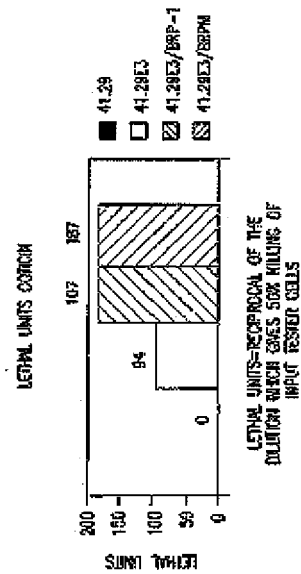


FIG. 24

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(251)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W/O 01.08.99

PCY/OSM/22242

26/42

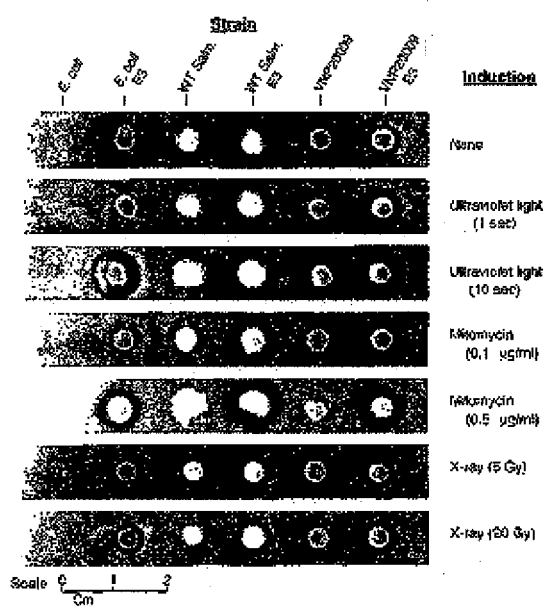
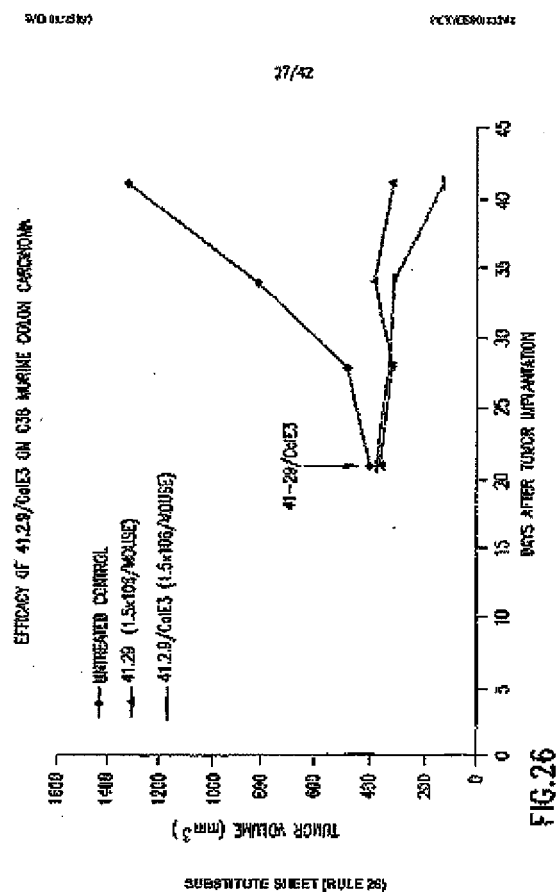


FIG.25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

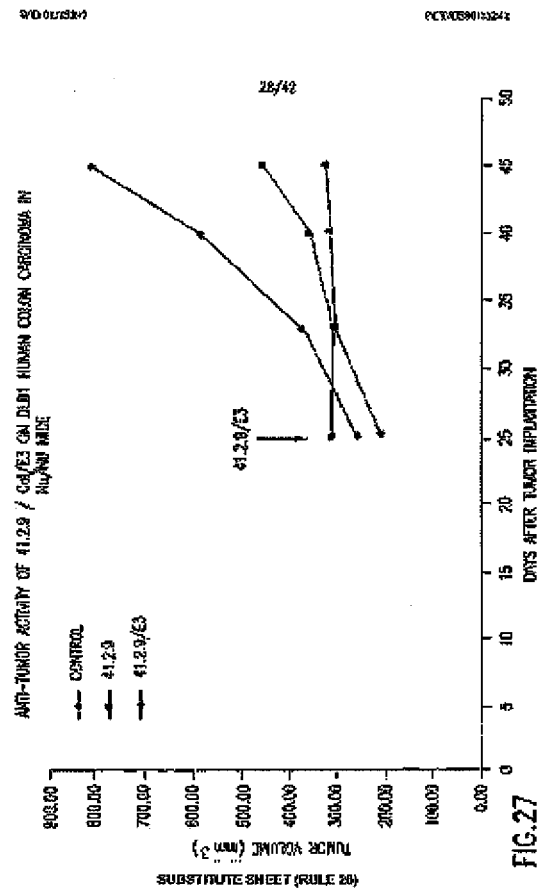
(252)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



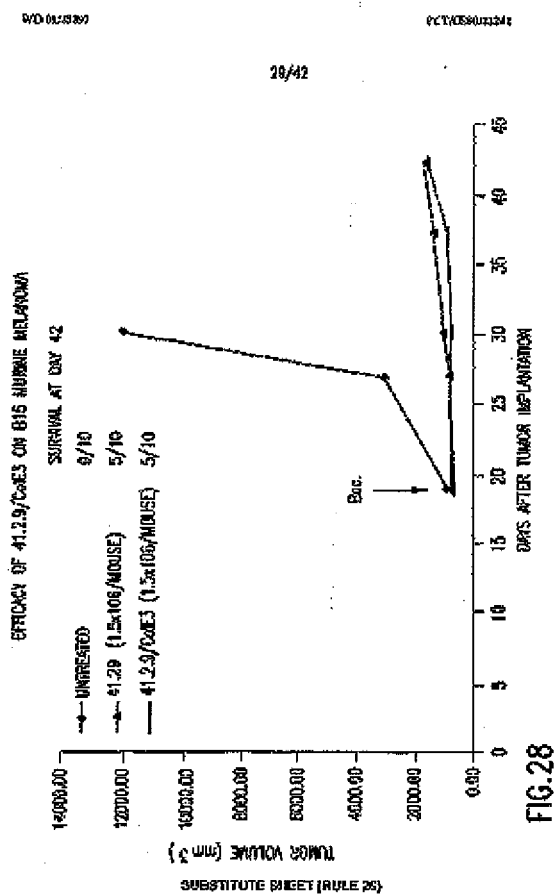
(253)

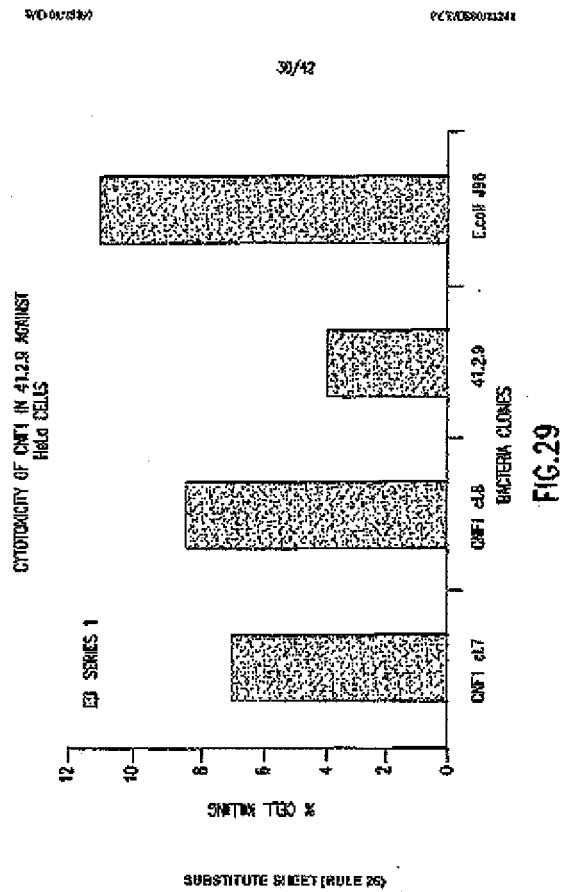
JP 2004-500042 A 2004.1.8



(254)

JP 2004-500042 A 2004.1.8





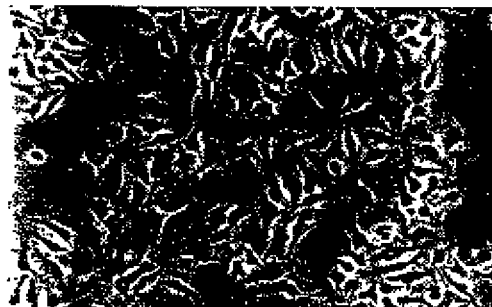
(256)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 06/23/01

PCT/US90/02242

31/42



NoLa untreated (20x Obj.)

FIG. 30A



NoLa CNF1 in OHSS GL15 (20x Obj.)

FIG. 30B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(257)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

5/000/0200

PCV0000000000

32/42

GATGATGTC TGGCTGTA GATGATGTC GTGAGGTA GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC 70
 AGCTGATGTC TATGATGTA GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC 140
 GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC 210
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC 280
 TATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 350
 GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 420
 GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 490
 GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 560
 GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 630
 GATGATGTC TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 700
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 770
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 840
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 910
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 980
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1050
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1120
 TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1190
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1260
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1330
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1400
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1470
 TATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1540
 GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC GATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC TATGATGTC 1610

FIG.31

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(258)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO 01/08197

PCY0039013242

33/42

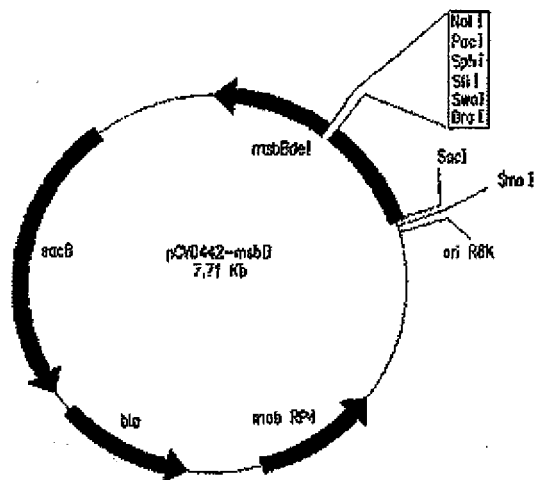


FIG.32

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(259)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

9/00178897

PCY/ES0123942

34/42

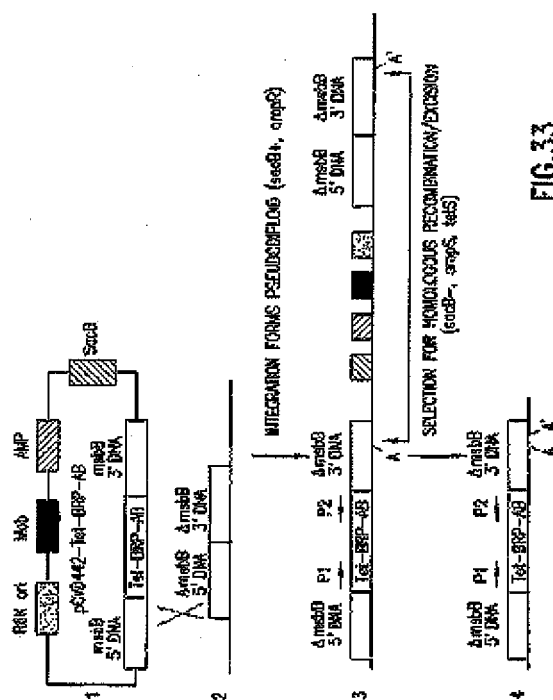


FIG.33

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(260)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

W/O.01.28.09 P.01.00.01.01.01

35/42

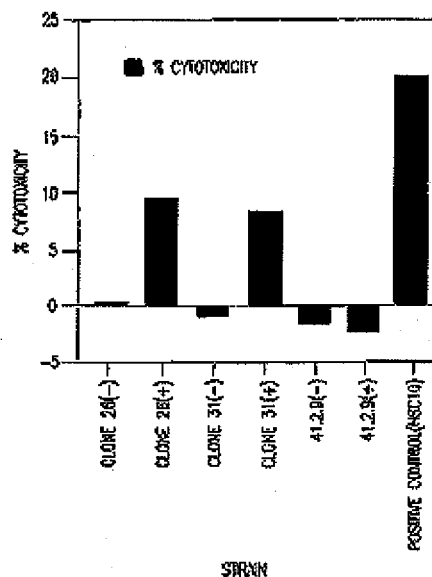


FIG.34

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(261)

JP 2004-506042 A 2004.1.8

අධ්‍යයනය

PC7A058(U7)Z4Z

36/42

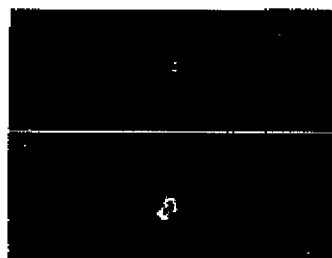


FIG. 35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(262)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

W/D 01/18/99

PCT/JP00/01224

37/42

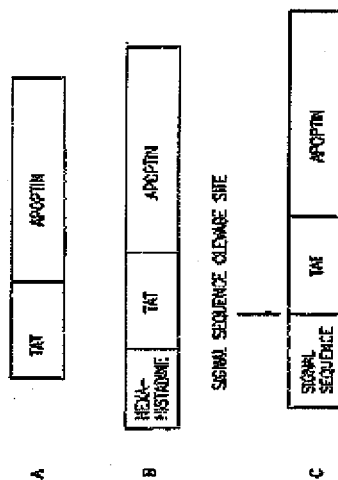


FIG. 36

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(263)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD01/28/97

PCT/JP00/01342

38/42

Protein Sequence of 616-4 F

Length of 616-4 F: 551 bp; Listed from 1 to: 551;

Translated from: 7 to: 409 (Entire region);

Genetic Code used: Universal; Wed, Aug 26, 2009 2:08 PM

Frame 1

N	A	T	E	S	R	K	R	R	Q	R	R	N	H					
ATG	ACC	ATG	GCT	TAT	GCC	AGA	AAA	AAA	AGA	CAG	AGA	AGA	ATC	AAC				
9				19			27			35			45					
A	L	Q	E	D	T	P	P	G	P	S	T	V	R	P	P	T	S	
GCG	CTG	CAG	GAA	GAT	ACC	CCG	CCG	GCC	ACG	TTC	ATG	TTT	GCC	CCG	CCG	ACC	TCC	
60				69				78				87			96		105	
S	R	P	I	E	T	P	H	C	R	E	I	R	I	G	I	A	Q	I
TCC	CCG	CCG	CTG	GAA	ACC	CCG	CAT	TCC	CCG	GAA	ATC	CCG	ATC	GCC	ATC	GCG	GCC	ATC
117				126				135				144			153			162
T	I	I	S	L	C	G	C	A	N	A	R	A	P	Y	L	R	S	
ACC	ATC	ACC	CTG	TCC	CTG	TCC	GCC	TCC	GCG	AAC	CCG	CCG	GCG	CCG	ACC	CTG	CCG	TCC
174				183				192				201			210			219
A	T	A	D	H	S	E	N	T	G	F	K	N	V	P	D	L	R	T
GCG	ACC	CCG	GAT	AAC	TCC	GAA	AAC	ACC	GCC	TTT	AAA	AAC	GTC	CCG	GAT	CTG	CCG	ATC
231				240				249				258			267			276
D	Q	P	K	P	P	S	K	K	R	S	C	D	P	S	E	T	R	V
GAT	CAG	CCG	AAA	CCG	CCG	TCC	AAA	AAA	GCC	TCC	TCC	GAT	CCG	TCC	GAA	TAT	CCG	GTC
288				297				306				315			324			333
S	E	L	K	E	S	L	I	T	T	T	P	S	R	P	R	T	A	R
TCC	GAA	CTG	AAA	GAA	TCC	CTG	ATC	ACC	ACC	ACC	CCG	TCC	CCG	CCG	ACC	ACT	CTC	GCC
345				354				363				372			381			390
R	C	I	R	L														
GAC	TGC	ATC	GCC	CTC	TGA	AGC	CTT	GCC	TGT	TTT	GCC	TGA	TGA	AGC	ATT	TTT	ATC	AGC
402				411				420				429			438			447
CTG	ATA	CAG	ATT	AAA	TCA	GAA	CCC	AGA	ACC	GAT	CTG	ATA	AAA	CAG	ATT	TTG	CCT	GAC
459				468				477				486			495			504
GAC	AGT	AGC	CCG	GTC	GTC	CCA	GCT	GAC	CCG	ATT	TCC	ACC	TCA	GA				
516				525				534				543						

FIG.37

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(264)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD000399

PCY00000399

39/42

Protein Sequence of PAP84 trLF

Length of PAP84 trLF: 752 bp; Listed from: 1 to: 442;

Translated from: 7 to: 427 (Entire region);

Genetic Code used: Universal; Rep. Aug 14, 2008 3:19 PM

```

Frame 1      N A M B H H H I Y G R E K R L
             NNS ACC ATG GGT CAT CAC CTT CAC CAC CAT TAT GGC GGC AAA AAA CCG CGT
             9      18      27      36      45

Q R R R K H A L Q E D T P P G P S T V
CAG CCG CGT GGC ATG AAC GCG CTG CAG GAA GAT ACC CCG CCG GGC CCG TCC ACC GTC
      60      69      78      87      96      105

F R P P T S S R P L E I P H C R E L R
TFT CCG CCG CCG ACC TGC TCC GCG CCG CTG GAA ACC CCG GAT TGC CCG GAA ATC CCG
      117      126      135      144      153      162

I G I A G I T I T L S L C G C A M A R
ATC GGC ATC GCG GGC ATG ACC ATC ACC CTG TCC CTG TGC GGC TGC GCG AAC CCG CCG
      174      183      192      201      210      219

A P T L R S A T A D N S E N T G F K M
GCG CCG ACC CTG CCG TCC GCG ATC GCG GAT AAC TCG GAG AAC ACC GCG TTT AAA AAC
      231      240      249      258      267      276

V P D L R T D Q F K P P S K K R S C D
GTC CCG GAT CTG CCG ACC GAT CAG GCG AAA CCG CCG TCC AAA AAA CCG TCC TCC GAT
      288      297      306      315      324      333

P S E Y R V S E L K E S L T T T P S
GCG TCC GAA TAT CCG GCG TCC GCG CCG CTG AAA GAA TCC CCG ATC ACC ACC ACC CCG TCC
      345      354      363      372      381      390

G P R T A R R C I N L *
GCG CCG CCG ACC GCG CCG CCG TCC ATC CCG CTG TCA GAG CTT GCG TTT TTT
      402      411      420      429      438

```

FIG.38

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

(265)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

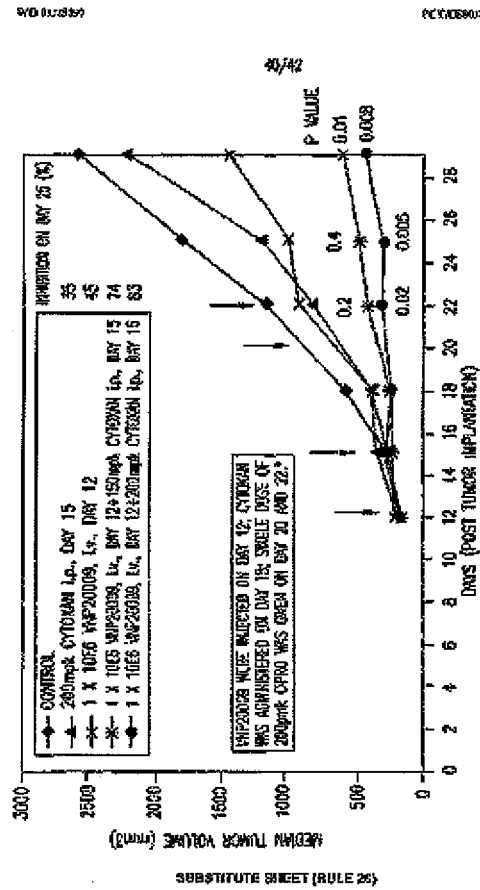
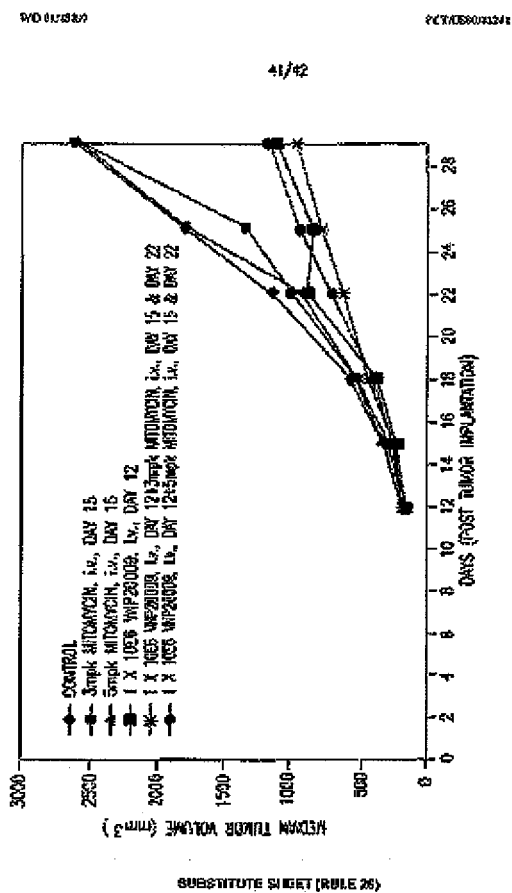


FIG.39

(256)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(267)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

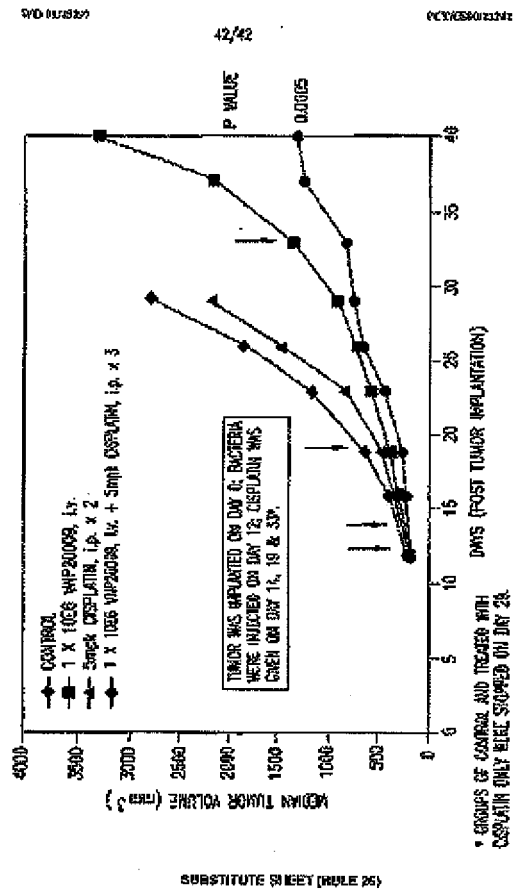


FIG.41

PCY/ISSUE/12/1

410. VISION PHYSIOLOGICAL, INC.

NEW STRATEGIES AND METHODS FOR Tumor-TARGETED DELIVERY OF THERAPEUTIC MOLECULES

«120», «1202-1203-223»

61501 60:257-581

6151- 1599-13-84

<140> 60/157,637

✓157: 2989-20-64

410. 51

c:\70> Net852 for Windows Version 3.0

23186 1

42112 56

4313; 20K

ఆంధ్రప్రదేశ్ శాసనసభ

१२३८७

42222 7074422 001000

44005 3

SECRET

35

4210 E

4.21 ± 0.04

212-200

[illegible]

220

4223. *Stylidium griseum*

6400-2

අනුප්‍රාප්තිකයෙහි ආත්මසම්පන්නතාව ප්‍රවෘත්තිමයවද අභිජනනාත්මකව හටගත්

44

4210. 3

2172 477

4272 UOLA

అక్షరములు

५२३॥७

~ 231.9 505

॥ ११ ॥ १०७४

4400, 3

Arg Gln Asp Ser Ser Ser Arg Trp Pro Ser Asp Lys Asn Val Ala His
1 5 10 15

45

17

14

5

1

3

የጥንቃቄነት ስራ

[illegible]

```
<370> D  
c2e1> 190  
c2q2> MFC  
c4j3> အမေရိကန်ပြည်ထောင်စုသမ္မတမြောက်အာဖရိကနိုင်ငံ
```

[illegible]

3

(274)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD01:2337

PCYU6003101

```

Pro Gln Glu Gln Ile Leu Ala Ser Thr Tyr Asn Asp Lys Gln Met Val
180 185 190
Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Leu Asp Phe Tyr Leu Met
195 200 205
Tyr Ser Ala Asp Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Ala Gln Tyr Gln Leu
210 215 220
Tyr Ser Ile Tyr Gln Gln Gln Tyr Ile Phe Gln Leu Lys Gln Asn Asp Lys
225 230 235
Ile Phe Val Ser Val Thr Ser Gln Asp Gln Ile Asp Met Asp His Gln
240 245 250
Ala Ser Thr Thr Gln Phe Phe Leu Val Gln
255 260
<210> 11
<211> 461
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> Fusion construct
<222> CDS
<223> 1)...(461)
<400> 11
atg aac aag cag gcc acc gaa ccc atg ctc ctg cag taa gag cag acc 45
acc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 50
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
agt gca gaa cag gcc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc 55
ser val ala gln ala ala pro thr ser ser ser ser ser ser ser ser 60
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
cga aac tta gag acc ctg ctg ctg gac cga atg acc ctg acc acc acc 65
acc gln leu gln ala leu leu leu leu leu leu leu leu leu leu leu leu 70
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 75
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 80
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 85
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 90
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 95
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 100
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 105
acc aac aac tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc 110
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

```

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

2

(277)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD000007
 PDE MIA QIA Ser Ito Ito Ser The Ser Ito
 165 240

<200> 15
 <210> 26
 <220> DNA
 <230> Artificial Sequence

<200>
 <220> Forward primer

<100> 25
 agatcagctc accgagcag gacagg 24

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<200>
 <220> Reverse primer

<400> 35
 agacagcagc tccacccacg ttttc 34

<210> 31
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <220> Forward primer

<400> 40
 agtccaccca gacccaccc caccacaaa c 39

<210> 40
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <220> Reverse primer

<600> 48
 agtccacccg tccacccacg ttttc 47

<210> 49
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <220> Forward primer

<400> 50
 gttg-cctctg gctc-cctctg gctc-cctctg 49

31

(279)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

VED 07/03/97
 CRYG/2002/2102
 <212> 46
 <212> 46
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Nucleotide sequence encoding TIMP3 46
 <400> 26
 gcgtatcgctg ggggcctggc cctatggctg ggggcctgct gctgctgctg 40
 gggcctg 46
 <210> 26
 <211> 181
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Oligonucleotide
 <400> 26
 gcgtatcgctg ggggcctggc cctatggctg ggggcctgct gctgctgctg 40
 gggcctg ggggcctgct ggggcctgct ggggcctgct g 46
 <210> 27
 <211> 181
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Oligonucleotide
 <400> 27
 gcgtatcgctg ggggcctggc cctatggctg ggggcctgct gctgctgctg 40
 gggcctg ggggcctgct ggggcctgct ggggcctgct g 46
 <210> 28
 <211> 181
 <212> PPT
 <213> PPT sequence
 <400> 28
 Met Ser Ser Ala Ala Gly Phe Cys Ala Ser Arg Phe Gly Phe Ser Phe
 1 5 10 15
 Asn Gly Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val Val Ala Val Ala Ala Gly
 20 25 30
 Ala Gly Gly Asp Gly Asp Leu Gly Cys Leu Cys Val Lys Thr Ser Ser
 35 40 45
 Glu Val Arg Pro Arg His Thr Thr Ser Leu Gly Val Thr Ala Gly
 50 55 60
 Phe His Cys Thr Thr Ala Gly Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
 65 70 75 80
 Lys Thr Cys Ser Asp Leu Gly Ala Phe Leu Cys Lys Lys Ile Thr Lys
 85 90 95
 Lys Leu Leu Gly Ser
 100
 <210> 29
 <212> 706

(280)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

W00010007

PCT/JP04/02402

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> Oligonucleotide

<400> 20
 ctccctctggc gggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc 60
 gctggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc 100

<210> 10
 <211> 106
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Oligonucleotide

<400> 10
 cggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc 60
 gctggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc 100

<210> 11
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 11
 His Tyr Ser Phe Asp Gly Arg Asp Ile Asn Thr Asp Phe Ser Tyr Pro
 1 5 10 15
 Ala Lys Val Ile Trp His Gly Ser Ser Phe His Gly Val Arg Leu Val
 20 25 30
 Asp Met Tyr Cys Glu Ala Trp Arg Thr Ala Asp Thr Ala Val Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ala Tyr Trp Ser Met Thr Gly Tyr Ile Leu Arg His Lys Ala Tyr
 50 55 60
 Ser Cys His Asn Arg Lys Ile Val Leu Tyr Phe Glu Asn Ser Thr Met
 65 70 75 80
 Thr Arg Phe Arg Lys
 85

<210> 12
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Oligonucleotide

<400> 10
 gggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc cggggggggc 40

<210> 13
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

13

በፍጥነት የሚፈጸም?

2680-15

၂၆၀၁-၁၁
 မြန်မာ့ပြည်ထောင်စု အကျဉ်းချုပ် ဝိသေသဗေဒ အကျဉ်းချုပ်

17

• 2009 34
• 2011 41
• 2012 44
• 2013 45

+4054 78

[illegible]

[illegible]

15

(283)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

5/12/2017

የፕላንና ሰነድ አቅርቦት

[illegible]

c210 15
+211 10
c212 200
c213 Arbitration? Regardano

[illegible]

අනුරූප 35
 පාලනකරු සහ පරිපාලන මණ්ඩලයේ සාමාජිකයන්ගේ

25

```

+270> 36
+271> 35
+272> 570
+273> Artificial language

```

02206
02210 Revised printer

၆၄၀၇၁ ၁၀
စာရင်းကိုင် ပုံနှိပ်ရန်အတွက် အောက်ဖော်ပြပါအတိုင်း ဖော်ပြပါ

35

```
<B20> 37
<B21> 37
<B22> 000,
<B23> Arithmetic Sequence
```

4323, Forward price

[illegible]

\$7

```

<210> 30
<211> 29
<212> 000
<213> Sequence=1 Sequence=

```

4220
4220 Nevada border

(284)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD 01/3527	PCYV6002342
<200> 10 gagcgctgacg cactgctgca atcgagctg	77
<210> 19 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> Forward primer	
<400> 39 ggttgagctt ctggagctca ctcttcctct tcaatga	95
<210> 40 <211> 50 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> Reverse primer	
<400> 68 taccgggata ctacgggata gggagctcag	59
<210> 67 <211> 69 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> Forward primer	
<400> 41 gttgagctt gttcctcag ctggagctt ctcttcctg	40
<210> 42 <211> 57 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> Reverse primer	
<400> 62 ggttgagctt gttcctcag ctggagctt ctcttcctg ctggagctt ctcttcctg ctggagctt ctcttcctg	60 59
<210> 61 <211> 71 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> Forward primer	
<400> 41 ggttgagctt gttcctcag ctggagctt ctcttcctg ctggagctt ctcttcctg ctggagctt ctcttcctg	60

(285)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SEQ ID NO	SEQUENCE	LENGTH
1	<210> 44 <211> 44 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> Reverse primer <400> 44 gggtcttctg ggtctctctg tggctctctg cgtctctg	71
2	<210> 45 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> Forward primer <400> 45 tttttttttt ggtctctctg tggctctctg cgtctctg	37
3	<210> 46 <211> 46 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> Reverse primer <400> 46 tttttttttt ggtctctctg tggctctctg cgtctctg	43
4	<210> 47 <211> 47 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> Forward primer <400> 47 tttttttttt ggtctctctg tggctctctg cgtctctg	49
5	<210> 48 <211> 48 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <221> Reverse primer <400> 48 gggtcttctg ggtctctctg tggctctctg cgtctctg	35

(286)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO 01/2837

OCY60802042

<213> 182
 <213> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 45
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 45
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 182

<213> 50
 <213> 183
 <213> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 50
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 50
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 183

<213> 81
 <213> 202
 <213> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 81
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 81
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 202

<213> 112
 <213> 205
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 112
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 112
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 205

<213> 133
 <213> 206
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 133
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 133
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 206

<213> 153
 <213> 207
 <213> Artificial Sequence
 <213>
 <213> Oligonucleotide
 <400> 153
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 153
 GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG 207

(287)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD01/2537 PC9702012142

<150> 64
 <151> 41
 <152> DNA
 <153> Artificial Sequence

<160>
 <161> Oligonucleotide

<170> 34
 GATGAGGATG GAGGAGGAGG ATGAGGATG GAGGAGGAGG C 41

<180> 55
 <181> 33
 <182> DNA
 <183> Artificial Sequence

<190>
 <191> Oligonucleotide

<200> 55
 GATGAGGATG GAGGAGGAGG ATGAGGATG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG 60
 GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG 60

<210> 66
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> Oligonucleotide

<230> 66
 GATGAGGATG GAGGAGGAGG ATGAGGATG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG 60
 GATGAGGATG GAGGAGGAGG ATGAGGATG GAGGAGGAGG 60

<240> 67
 <241> 99
 <242> DNA
 <243> Bacteriophage

<250>
 <251> 100
 <252> (7) ...14601

<261> modified base
 <262> (1) ...141
 <263> base, C, G, or T

<270> 57
 GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG 10
 GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG 10

<280> 57
 GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG 10
 GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG GATGAGGATG 10

[illegible]

©C 97E180 M23142

[illegible]

c2704 G1
c2717 TPOB
w2720 DDA
c2723 Sylvania

4999 17

[illegible]

【國際調查報告】

[illegible]

(293)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP03/03332
C (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification	Relevant to the invention
Y	Classified documents, especially those which are relevant to the invention D201111 - Improved method for producing a polymer having a specific structure (Abstract) - "Concrete: Vol. 17, No. 16, July 1976, abstract only."	YES

Form PCT/ISA/210 (second part) (March 2003) (July 1998)

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

(295)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL APPLICATION NO.

PCT/JP2003/000000

This International Search Report has been prepared by the International Searching Authority in accordance with the provisions of the PCT. This report contains the following information which may be used to determine the patentability of the invention. It is not intended to be exhaustive, but it is intended to provide a preliminary indication of the patentability of the invention.

Group 1, classes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064, 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139, 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178, 1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197, 1198, 1199, 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, 1578, 1579, 1580, 1581, 1582, 1583, 1584, 1585, 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1594, 1595, 1596, 1597, 1598, 1599, 1600, 1601, 1602, 1603, 1604, 1605, 1606, 1607, 1608, 1609, 1610, 1611, 1612, 1613, 1614, 1615, 1616, 1617, 1618, 1619, 1620, 1621, 1622, 1623, 1624, 1625, 1626, 1627, 1628, 1629, 1630, 1631, 1632, 1633, 1634, 1635, 1636, 1637, 1638, 1639, 1640, 1641, 1642, 1643, 1644, 1645, 1646, 1647, 1648, 1649, 1650, 1651, 1652, 1653, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1660, 1661, 1662, 1663, 1664, 1665, 1666, 1667, 1668, 1669, 1670, 1671, 1672, 1673, 1674, 1675, 1676, 1677, 1678, 1679, 1680, 1681, 1682, 1683, 1684, 1685, 1686, 1687, 1688, 1689, 1690, 1691, 1692, 1693, 1694, 1695, 1696, 1697, 1698, 1699, 1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1705, 1706, 1707, 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715, 1716, 1717, 1718, 1719, 1720, 1721, 1722, 1723, 1724, 1725, 1726, 1727, 1728, 1729, 1730, 1731, 1732, 1733, 1734, 1735, 1736, 1737, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742, 1743, 1744, 1745, 1746, 1747, 1748, 1749, 1750, 1751, 1752, 1753, 1754, 1755, 1756, 1757, 1758, 1759, 1760, 1761, 1762, 1763, 1764, 1765, 1766, 1767, 1768, 1769, 1770, 1771, 1772, 1773, 1774, 1775, 1776, 1777, 1778, 1779, 1780, 1781, 1782, 1783, 1784, 1785, 1786, 1787, 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793, 1794, 1795, 1796, 1797, 1798, 1799, 1800, 1801, 1802, 1803, 1804, 1805, 1806, 1807, 1808, 1809, 1810, 1811, 1812, 1813, 1814, 1815, 1816, 1817, 1818, 1819, 1820, 1821, 1822, 1823, 1824, 1825, 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832, 1833, 1834, 1835, 1836, 1837, 1838, 1839, 1840, 1841, 1842, 1843, 1844, 1845, 1846, 1847, 1848, 1849, 1850, 1851, 1852, 1853, 1854, 1855, 1856, 1857, 1858, 1859, 1860, 1861, 1862, 1863, 1864, 1865, 1866, 1867, 1868, 1869, 1870, 1871, 1872, 1873, 1874, 1875, 1876, 1877, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, 1883, 1884, 1885, 1886, 1887, 1888, 1889, 1890, 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896, 1897, 1898, 1899, 1900, 1901, 1902, 1903, 1904, 1905, 1906, 1907, 1908, 1909, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1915, 1916, 1917, 1918, 1919, 1920, 1921, 1922, 1923, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928, 1929, 1930, 1931, 1932, 1933, 1934, 1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943, 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187,

Insert: no application, no fee
Port: 1080/3322

[illegible]

Form PC-TJ-8A (2-78) Date: 12-20-83 Page: 1 of 1

PLT/US53125302

<http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N...> 9/18/2007

Local application No.
PC901356483042

Group 24	(China 51)
Group 25	(China 52)
Group 26	(China 61)
Group 27	(China 62)
Group 28	(China 70)
Group 29	(China 71)
Group 30	(China 72)
Group 31	(China 73)
Group 32	(China 74)
Group 33	(China 75)
Group 34	(China 76)
Group 35	(China 77)
Group 36	(China 78)
Group 37	(China 79)
Group 38	(China 80)
Group 39	(China 81)
Group 40	(China 82)
Group 41	(China 83)
Group 42	(China 84)
Group 43	(China 85)
Group 44	(China 86)

(299)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 7/06	
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/035	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 14/16	
C 0 7 K 14/035	C 0 7 K 14/225	
C 0 7 K 14/16	C 0 7 K 14/50	
C 0 7 K 14/225	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/50	C 1 2 N 1/21	
C 0 7 K 19/00	A 6 1 K 37/48	
C 1 2 N 1/21	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,S2,TZ,UG,ZW),EACAM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),GA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TC),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MX,MZ,ND,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,S I,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 バームデス、デヴィッド、ジー。

アメリカ合衆国 0 6 4 9 2 コネティカット州、ウォーリングフォード、ノース メイン ストリート 524

(72)発明者 キング、イヴァン、シー。

アメリカ合衆国 0 6 4 7 3 コネティカット州、ニュー ヘブレン、ブルー ヒルズ ロード 65

(72)発明者 クレアモント、キャロライン、エー。

アメリカ合衆国 0 6 4 1 0 コネティカット州、チェシャー、マーウィン サークル 80

(72)発明者 リン、スタンレー、エル。

アメリカ合衆国 0 6 4 4 3 コネティカット州、マディソン、オールド トール ロード 178

(72)発明者 ベルコート、マイケル

アメリカ合衆国 0 6 9 4 2 コネティカット州、ウォーリングフォード、アルゴンキン ドライブ 9

Fターム (参考) 4B024 AA01 BA28 BA30 CA04 DA05 HA17

4B065 AA46X AB01 CA24 CA31 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 AA19 BA03 CA53 DC02 DC22 DC50

MA02 NA14 ZB212 ZB262

4C087 AA01 AA02 AA03 BC35 CA09 MA02 NA14 ZB21 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 DA01 DA14 DA83 DA89 EA20 FA74